



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ВАРНА  
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

д-р Мари Ара Хачмериян-Андреева

**МАЙЧИН БИОХИМИЧЕН СКРИНИНГ  
КАТО МЕТОД ЗА ПРЕНАТАЛНА  
ГЕНЕТИЧНА ПРОФИЛАКТИКА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на научна и образователна степен  
„доктор“

Област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”  
Професионално направление: „Биологически науки” Шифър 4.3.  
Научна специалност: „Генетика”

Научен ръководител: Доц. д-р Людмила Ангелова, д.м.

Научно жури: проф. Алексей Савов, доц. д-р Емил Ковачев, Доц. Д-р Катя  
Ковачева, доц. Албена Тодорова

Варна, 2017

Дисертационният труд съдържа 128 стандартни страници, 21 фигури, 26 таблици и 4 приложения.

Библиографията включва 28 заглавия на български и 152 на английски език.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет към Катедра по медицинска генетика, Медицински университет – Варна.

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по медицинска генетика, Медицински университет – Варна, ул. Марин Дринов №55, Варна и са публикувани на сайта на МУ Варна.

*Номерата на таблици и фигури в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.*

Въз основа на заповед № Р-109-160 от 27.05.2017г, официална защита ще се състои на..... от..... часа в.....

# Съдържание

<b>I. Въведение .....</b>	<b>7</b>
<b>II. Цел и задачи .....</b>	<b>8</b>
<b>III. Материал и методи .....</b>	<b>9</b>
1. Материал .....	9
1.1. Клиничен материал (изследвани пациенти) .....	9
1.2. Биологичен материал (проби) .....	10
2. Методи .....	11
2.1. Анкетен (анамнестичен) метод .....	11
2.2. Биохимичен метод .....	11
2.2.1. За изпълнение на късен скрининг .....	11
2.2.2. За изпълнение на ранен (комбиниран) скрининг .....	12
2.3. (Цито)генетичен метод за пренатална диагностика на хромозомни болести .....	13
2.4. Документален метод .....	13
2.5. Статистически метод .....	14
2.6. Софтуерни програми .....	15
2.7. Дефиниране на използваните в настоящото проучване категории .....	15
<b>IV. Резултати и обсъждане .....</b>	<b>16</b>
1. Резултати от биохимичен скрининг .....	16
1.1. Резултати и обсъждане от късен биохимичен скрининг .....	16
1.1.1. Характеристика на групата жени, провели БХС2 .....	16
1.1.2. Разпределение на изследваната група по рискови категории .....	20
1.1.3. Принос на БХС2 за разкриване на хромозомни анеуплоидии .....	21
1.1.4. Анализ на биохимичните показатели .....	24
1.1.5. Ролята на БХС2 за разкриване на вродени аномалии – ДНТ, предна коремна стена .....	24
1.2. Резултати и обсъждане на ранен комбиниран скрининг .....	25

1.2.1. Характеристика на групата жени, провели КБХС1 .....	25
1.2.2. Разпределение на изследваната група по рискови категории .....	28
1.2.3. Принос на КБХС1 за разкриване на хромозомни анеуплоидии.....	29
1.2.4. Анализ на биохимичните показатели.....	33
1.2.5. Ролята на специализирания УЗ преглед за „фетална анатомия“.....	34
1.3. Резултати и обсъждане на скрининг с изчисляване на интегриран риск..	37
1.3.1. Характеристика на групата жени, изследвани с изчислен ИР.....	37
1.3.2. Разпределение на изследваната група по рискови категории .....	40
1.3.3. Принос на оценката на ИР за разкриване на хромозомни анеуплоидии.....	41
1.4. Сравнителни данни на ефекта от трите различни оценки на риск .....	45
2. Резултати и обсъждане на данни от инвазивна пренатална диагностика .....	53
3. Медико-генетична консултация .....	61
4. Обобщение .....	64
<b>V. Изводи .....</b>	<b>65</b>
<b>VI. Заключение и бъдещи насоки за развитие .....</b>	<b>67</b>
<b>VII. Приноси на дисертационния труд.....</b>	<b>69</b>
<b>VIII. Научни публикации по темата на дисертационния труд .....</b>	<b>70</b>
<b>IX. Научни съобщения по темата на дисертационния труд .....</b>	<b>71</b>
<b>X. Благодарности.....</b>	<b>72</b>

## Използвани съкращения

АЦ – амниоцентеза

БХС – биохимичен скрининг

БХС2 – късен биохимичен скрининг

ИР – биохимичен скрининг с изчисляване на интегриран риск

КБХС1 – ранен комбиниран биохимичен скрининг

ЛМГВ – Лаборатория по медицинска генетика - Варна

НГЛ – Национална генетична лаборатория

НЕГИ – неинвазивно генетично изследване

МГК – медико-генетична консултация

ППС – позитивна предиктивна стойност

ФН – фалшиво негативни

ФП – фалшиво позитивни

ПД – пренатална диагностика

AFP – алфа-фетопротеин

free  $\beta$ hCG – човешки хорионгонадотропен хормон, свободна фракция на  $\beta$  субединицата

ISPD – International Society of Prenatal Diagnosis

ISUOG – International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology

MoM – част от медианата

PAPP-A – плазмен протеин асоцииран с бременността

uE3 – неконюгиран естриол



## I. Въведение

Генетичният скрининг касае социално значими заболявания, асоциирани с тежка клинична картина и/или намален интелект, като акцентира върху откриването на синдрома на Даун (тризомия 21) – най-честата значима анеуплоидия.

Майчиният биохимичен анализ, като скринингово изследване, не поставя диагноза и изисква последващи потвърждаващи анализи. Прилаганите методи за пренатална диагностика, амниоцентеза и хорионбиопсия носят риск от спонтанен аборт или други усложнения. В рутинната практика рискът от хромозомни аномалии се оценява на базата на различни комбинации от възрастта на майката, предишна засегната бременност или фамилна анамнеза, биохимични тестове на майчиния серум, фетални ултразвукови маркери и анализ на свободно циркулираща фетална ДНК в майчината кръв.

Оценка на основните елементи за валидността на генетичния тест - неговата чувствителност, специфичност и позитивна предиктивна стойност, са необходими при анализ на ефективността на скрининга. Резултатите очаквано варират в зависимост от възприетите подходи в различните страни. Включването на различни комбинации от маркери, различни гранични стойности и използването на разнообразни софтуерни програми за оценка на риска отново са предпоставка за различия в крайното представяне на генетичната скринингова програма.

Широко възприета част от пренаталното грижа в повечето развити страни е да се осигури оценка на индивидуалния риск за фетални анеуплоидии и да се предложи окончателна диагноза, ако рискът се счита за повишен. Много висока чувствителност и специфичност са съобщени при скрининг с неинвазивни генетични тестове на фетална ДНК - бърз и точен метод, но масовото му предлагане на бременни не е реална опция за повечето страни по финансови причини.

Методите за инвазивна пренатална диагностика с генетичен анализ имат своите ограничения, възможности и рискове. Те са в компетенциите на висококвалифицирани и малобройни специалисти, а от друга страна са скъп метод за потвърждаване или отхвърляне на диагнозата. За това индикациите следва да бъдат строго прецизирани, а резултатите - максимално точни и недвусмислени, предоставени бързо и с подходящ коментар на семейството.

Генетично консултиране трябва да съпътства всяка стъпка от грижата за бременната, като внимателно пояснява различните аспекти на тестовете

(предимства и недостатъци), тъй като наред с възможностите, които предлагат скрининговите програми, те поставят и редица морални и правни въпроси. Подробно и оптимално с бременната и нейния партньор следва да бъдат разгледани въпросите за тежестта на заболяването, има ли лечение и в каква степен е то, е ли прекъсването на бременността допустима възможност за семейството, наличен ли е точен диагностичен пренатален тест, има ли значим риск от усложнение на бременността.

На база мащабни проучвания и резултати от дългогодишен опит, описани в литературата, в световен план са налични утвърдени практики за скрининг на бременни за най-честите анеуплоидии. Общоприети са няколко основни модела за провеждане на биохимичен скрининг – комбиниран, последователен, интегриран, контингентен при цитирани различни стойности на cut off. Стремешт е към фиксиране на ФП на и под 3% при постигане на максимална чувствителност. Съществуват работни групи, предлагащи алгоритми за добра практика в сферата на превантивните скринингови програми за анеуплоидии. Въпреки това не съществува категорично мнение за избор на конкретен подход.

За българската популация липсват систематизирани резултати за дълъг период от време. За анализ на ефекта от дейността е необходима оценка на основните елементи за валидността на генетичния тест - неговата *чувствителност, специфичност и позитивна предиктивна стойност*. Фалшиво негативните и фалшиво позитивните резултати следва да бъдат минимизирани, извеждайки оптимални cut off граници и подходи за поведение при междинни или некатегорични резултати.

## II. Цел и задачи

### Цел

Проучване ефекта от дейността по майчин биохимичен скрининг като метод за пренатална генетична профилактика на база опыта на Лаборатория по медицинска генетика - Варна за период от 10 години.

### Задачи

1. Да се характеризира групата пациенти, включени в изследването, по различни количествени и качествени признаци.
2. Да се обобщят и анализират резултатите от проведения *късен и ранен* майчин серумен скрининг и *интегрирана* оценка на риска за синдром на Даун и други често срещани анеуплоидии и някои вродени аномалии, като се



изчислят фалшиво положителните, фалшиво отрицателните рискове и позитивната предиктивна стойност на рисковете

3. Да се проведе сравнителен анализ между използваните **подходи** (КБХС1, БХС2, ИР) за оценка на тяхната чувствителност като препоръка за поведение при бременни жени за целите на генетична профилактика на хромозомни болести.
4. Да се обобщят и анализират резултатите от проведен **пренатален цитогенетичен анализ** при жени с повишен риск от серумен скрининг за диагностично проследяване на високорисковите бременности.
5. Да се оцени **майчиният възрастов фактор** като показание за БХС и АЦ според възможностите и ограниченията на приложените подходи за скриниране и диагностика на анеуплоидии при бременни в различни възрастови групи - над и под 35 години.
6. Да се характеризират субективни причини и анализира връзката и значението на **ултразвуковия преглед за надеждността** на резултатите при генетичния скрининг извън значението му на диагностичен подход за фетални структурни аномалии.
7. Да се анализира ролята и проблемите на **медико-генетичното консултиране** при бременни жени с потенциален или реален повишен генетичен риск за раждане на дете с хромозомна болест или друга вродена аномалия, разкривана чрез биохимичен скрининг.

### III. Материал и методи

#### 1. Материал

##### 1.1. Клиничен материал (изследвани пациенти)

За период от 10 години, от месец март 2005 г. до месец декември 2014 г., са проведени изследвания на **22 839** бременни жени, преминали през Лаборатория по медицинска генетика при УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД - Варна. Изработвани са проби на пациенти основно от област Варна и по-малък брой от Бургас, Шумен, Търговище, Разград, Добрич.

Според основните задачи на проучването пациентите са разпределени, както следва:

- Бременни, провели *само* ранен комбиниран скрининг (11-13+6 г.с.) - **7 303** жени (31.9 %).
- Бременни, провели *само* късен биохимичен скрининг (15-20+г.с.) – **13 924** жени (61%).

- Бременни, провели *и ранен, и късен* скрининг с изчисляване на интегрирана оценка на риска – **1 612** жени (7.1%).

От тях 17 033 (**74.6%**) на възраст под 35 години и 5 806 (**25.4%**) над 35 години, средна възраст **30.5 г.** (Таблица 1).

*Таблица 1. Брой проведени изследвания за анализирания период, разделени по тип изследване и възраст на бременната*

Общо 22 839					
КБХС1 7 303		БХС2 13 924		ИР 1 612	
≤ 35 г.	> 35 г.	≤ 35 г.	> 35 г.	≤ 35 г.	> 35 г.
6 413	890	9 564	4 360	1 056	556

Цитогенетичен анализ е проведен на **675** бременни в Лабораторията по медицинска генетика - Варна, за период от 10 години (2006 до 2016 вкл.). Това са 324 (**48%**) жени на възраст под 35 години и 351 (**52%**) над 35 години, средна възраст **34.5 г.**

## 1.2. Биологичен материал (проби)

За провеждане на БХС от всяка бременна е взета венозна кръв чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. За изолирането на серум кръвта е събирана във вакутейнери с гел (3 ml). Центрофугирането на кръвта се провежда в рамките на 2 часа, а отделеният серум се съхранява в хладилник до изработване на пробите (до 7 дни след пробовземането).

Манипулацията амниоцентеза се провежда в СБАЛАГ “Майчин дом“ - Варна от 2006 г., като амниотичната течност се подлага на цитогенетичен анализ в ЛМГ-Варна и ДНК анализ в ГМДЛ Геника - София, по показания - в Национална генетична лаборатория. Материалът за култивиране на амниоцити се взема стерилно под ехографски контрол, 1 епруетка с **10** мл за посевка в хранителна среда и 1 епруетка с 5-6 мл се транспортира за ДНК изолиране и последващ анализ в София. Останалото количество биологичен материал, след изработване на пробите, се съхранява при -20°C в Лабораторията по медицинска генетика - Варна съобразно медицинския стандарт.

## 2. Методи

### 2.1. Анкетен (анамнестичен) метод

Събирането на данни е осъществено чрез анкетен метод за всички бременни жени, посетили лабораторията - **15 435**. Необходимата информация, в това число възраст на бременната в години и месеци, срок на бременността в гестационни седмици и дни, телесно тегло на жената в килограми, приложение на асистирана репродукция, тютюнопушене, прием на медикаменти, данни за патология в рода, поредност на бременността, заедно с данните от УЗ преглед, са попълнени върху формуляр, съдържащ информация и информирано съгласие от бременната.

При всички бременни, посетили генетичната лаборатория, е провеждана първична консултация с пояснение възможностите и ограниченията на изследването. При рискови семейства се провежда и вторична консултация с предоставяне на *писмена* информация с цел автономно информирано решение за провеждане на диагностична процедура.

В обсега на обхванатия период генетичен скрининг е провеждан само при едноплодни бременности.

### 2.2. Биохимичен метод

#### 2.2.1. За изпълнение на късен скрининг

**Късен биохимичен скрининг (БХС2)** за синдром на Даун, дефект на невралната тръба и коремната стена при бременни жени в 15-20<sup>+</sup> г.с. се прилага едновременно изследване в единична проба на серумните нива на алфа-фетопротеин и свободен бета-хорионгонадотропин (hAFP / free  $\beta$ hCG Dual) чрез флуориметър "DELFIA". От началото на 2014 г. е включен и трети биохимичен маркер свободен естриол (uE) (готов кит за работа на Perkin Elmer, протокол за работа, включен към кита).

Апаратът е с полуавтоматизирана система на работа (ръчно разреждане и накапване на проби, контроли и стандарти), снабден с *програма MultiCalc2000* за извеждане на индивидуалните стойности на биохимичните маркери.

През 2009 г. е инсталирана *програма Medexpert* за включване в обща национална мрежа с централен обслужващ сървър в Национална генетична лаборатория - София, където се извършва оценка на риска със софтуер Life Cycle 3.2 (Perkin Elmer) и апаратура, сертифицирани за работа от Fetal Medicine Foundation, London. Осъвременяването на програмата добавя възможност за оценка на риска и за синдром на Едвардс (тризомия 18) при късен скрининг тест. Необходими са следните параметри:

- 2 или 3 биохимични маркера (AFP отчитан в U/ml, free hCG отчитан в ng/ml, uE3 nmol/L); те са оценявани в референтни граници и отразявани чрез т.нар. МоМ;
- точна възраст на бременната към датата на раждане (в години и месеци);
- точен срок на бременността по УЗ морфологични маркери и стойност на BPD - в гестационни седмици и дни (информацията се подава от насочващия АГ специалист или специалист по образна диагностика);
- телесно тегло на бременната (в кг).

Серумните биомаркери са оценявани за риск според МоМ (средни стойности при засегнатите бременности като отклонение от медианата при нормалните бременности). При първоначално отсъствие на МоМ стойности за българската популация са приети тези по литературни данни. В последствие Национална генетична лаборатория периодично осъвременява референтните стойности на МоМ, специфични за българската популация на база достигнат висок брой преминали пациенти.

### **2.2.2. За изпълнение на ранен (комбиниран) скрининг**

Самостоятелно изработване на проби от **ранен (11-13<sup>+6</sup> г.с.) скрининг** KBXC1 стартира през 2009 г. Използва се за оценката на риска за синдром на Даун, синдром на Едвардс, синдром на Патау, синдром на Търнър (нехидропсен) и триплоидия (немоларна) при следните необходими параметри:

- 2 биохимични маркера: PAPP-A, отчитан в mU/l и free hCG отчитан в ng/ml; те са оценявани в референтни граници и отразявани чрез т.нар. МоМ;
- УЗ маркери: точно замерени нухална транслуценция (NT) в мм, CRL в мм, +/- отчитане наличие на носни кости (по данни на насочващия специалист по АГ или по образна диагностика);
- точна възраст на бременната към датата на раждане (в години и месеци);
- точен срок на бременността по УЗ (в гестационни седмици и дни) възможен в рамките на CRL 41-79 мм (информацията се подава от насочващия АГ специалист или специалист по образна диагностика);
- телесно тегло на бременната (в кг).

Серумните биомаркери са оценявани за риск според МоМ (аналогично на BXC2).

### **2.3. (Цито)генетичен метод за пренатална диагностика на хромозомни болести**

След провеждане на амниоцентеза пренатален цитогенетичен метод е приложен при **675** бременни жени за анализирания период (2006-2016). Стартира в края на 2006 година, в организация между специалист по АГ и присъствие на генетик-консултант до 2011 година. Тя се *извършва* само в частна болница СБАЛАГ „Майчин дом” - Варна от един акушер-гинеколог.

След предварителна генетична консултация, проведена в АГ клиниката с разяснение на предимства, рискове от манипулацията и предлаганите генетични методи за последващ анализ (цитогенетичен и ДНК), се получава информирано съгласие и биологичният материал (амниотична течност) се насочва към съответната лаборатория. Това са Лаборатория по медицинска генетика при УМБАЛ „Св. Марина” - Варна за тъканно култивиране с хромозомен анализ и частната ГМДЛ Геника - София за бърз ДНК анализ за анеуплоидии (в редки случай по показание за позитивна фамилна история за наследствено заболяване и към НГЛ). Резултатите от двата анализа се получават в рамките съответно на 14-21 и 6-7 дни.

Като инвазивна процедура, свързана с известен риск от загуба на плода, амниоцентезата се предлага само при определени *показания*. *Цитогенетичният метод* върху биологичен материал от амниотична течност е извършван по *установен протокол* и в съгласие с Медицински стандарт „Медицинска генетика“. *Хромозомният анализ* се провежда върху 10-20 метафазни пластини, диференциално оцветени GTG при средна резолюция 300-400 бенда. Рутинно използваната методика за цитогенетичен анализ не дава възможност за диагностициране на малки хромозомни преустройства, нискостепенен мозаицизъм и микроделеционни синдроми.

### **2.4. Документален метод за ретроспективно проследяване изхода на рисковите бременности**

Подходът за набиране на максимално пълна информация за изходите на високорисковите бременности и проследяване развитието на бременността включва събиране на данни чрез:

- **Резултати от постнатален цитогенетичен анализ на деца**, изследвани за хромозомна болест и родени в обсега на обслужваните от ЛМГВ неонатологични и педиатрични звена. Допуска се, че малък процент жени с повишен риск от скрининг в ЛМГВ са родили извън региона и са останали непроследени.

- Резултатите от проведена АЦ на *бременни жени* във Варна (единствено звено за инвазивна пренатална диагностика в Североизточна България). Данните са съвкупност от изследване на амниотичен материал като резултати с цитогенетичен анализ в ЛМГ-Варна и ДНК анализ в ГМДЛ Геника - София (в 100% от провелите АЦ във Варна). Пациентки, провели амниоцентеза в специализирани АГ клиники в София имат резултати от генетичен анализ, прикачени към общата система за регистрация за скрининг. Информация за тези от тях избрали СБАЛАГ „Майчин дом“ фигурира в общата база данни на НГЛ и резултатите от дородовата диагностика са включени в настоящата работа.
- Индивидуален контакт за обратна връзка за изхода от бременността, препоръчвана при рискови бременности (по телефон, на място, със служебно писмо).

Информация за изхода на бременността се базира на проведената дородова диагностика при жени с показания от биохимичен скрининг и послеродов цитогенетичен анализ на новородени и деца със съмнение за хромозомно заболяване, родени на територията на Варна. При бременности с повишен риск и липса на данни за изхода на бременността информация е потърсена по телефон. Данни за разкрита пренатално патология е събрана от резултати на цитогенетичен и ДНК анализ на амниотичен материал в няколко лечебни заведения.

Резултатите от броя и вида на проведените изселвания за период от 2005 до 2014 година са обобщени с Excel на база наличната софтуерна програма, архивираща всички проведени анализирани проби за БХС след обновяване на софтуера през 2009 г. Информация, касаеща проведените анализи до 2009 г., както и проведените цитогенетични анализи на амниоцити е обобщена на база наличните лабораторни журналы и архиви с разрешението на началника на ЛМГВ за съответния период.

## 2.5. Статистически метод

Изчислени са средна аритметична стойност на изследваните величини (mean)  $\pm$  стандартно отклонение (SD), приложен е t-тест. Констатираните различия са приети за статистически значими, потвърждаващи алтернативната хипотеза при  $p < 0.05$  и са представени графично.

За всяко приложено изследване (КБХС1, БХС2, ИР и АЦ) са изчислени реално положителни, реално отрицателни, фалшиво положителни и фалшиво отрицателни резултати, както и чувствителност, специфичност и позитивно

предиктивна стойност на използваните подходи (контингентен, интегриран и последователен скрининг).

## 2.6. Софтуерни програми

Резултатите са систематизирани с Microsoft Excel (MS Office): софтуерна програма за обработка на цифрови данни. При статистическата обработка на данните от цялостното проучване, за получаване на количествен и графичен резултат, е използван GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA.

## 2.7. Дефиниране на използваните в настоящото проучване категории

За определяне риска за T21, T18, T13, монозомия X и триплоидия при провеждане на *ранен комбиниран биохимичен скрининг* е приет следният подход:

След КБХС1 при МГК резултатите се класират на: „нисък риск”, „висок риск”, „междинен риск”. При: а) нисък риск  $<1$  на 1000 – не се предлага допълнителен късен скрининг; б) междинен риск 1 на 250 до 1 на 1000 – се предлага допълнителен късен скрининг и фетална морфология в 19-23 г.с. с избор на интегриран риск по желание. Като междинни се определят стойности, независимо дали са от комбинирана оценка на УЗ и биохимични показатели или са повишени (по-високи от 1/240) само от биохимични показатели (посочени в „Информация за консултиращия лекар“); 3) с висок риск  $> 1$  на 250 за T21 и 1 от 100 за T18 и T13 – с препоръка за провеждане на пренатален диагностичен тест.

Генетичната консултация предлага диагностична амниоцентеза (рядко хорионбиопсия) при риск  $>1:250$ , когато семейството не желае да продължи с късен скрининг и да се възползва от оценка на „интегриран риск”.

**Късен биохимичен скрининг.** При бременни с резултат “повишен риск” за T21 (риск  $> 1:250$ ) и за синдром на Едвардс (до 2009 г. оценяван чрез анализ на биохимичните показатели) се предлага специализирано УЗ изследване за “фетална морфология” в 17-18 г.с. и извършване на диагностично манипулация „амниоцентеза” с генетично изследване. Рискът за ДНТ/коремна стена се отчита на програмата като повишен при  $AFP \geq 2.5$  МоМ. Резултатът е информативен, при условие че бременността е в срок над 15 г.с.

**Интегрирана оценка** на риска за T21 и T18 от края на 2010 година при всички бременности, пожелали такъв или по показание, е възможен след комбиниране на данните от КБХС1 и БХС2. Резултатът се отчита като повишен при риск  $> 1:250$ .

Изследванията са контролирани от Национална генетична лаборатория - София, където се извършва и централизираното изчисляване на риска.

## IV. Резултати и обсъждане

### 1. Резултати от биохимичен скрининг

Проведен е ретроспективен анализ за оценка на броя преминали жени, разпределение по години, възраст, изчислени рискове и разкрита патология. Изчислени са чувствителност, специфичност, позитивна предиктивна стойност на KBXC1, BXC и ИР с проследяване на изход от бременността при жени с висок риск.

Изчислени са фалшиво положителни и фалшиво отрицателни резултати с анализ на случаите с патология и коментар при интерпретиране на рисковете. Обсъждат се проблеми в анализа и консултирането.

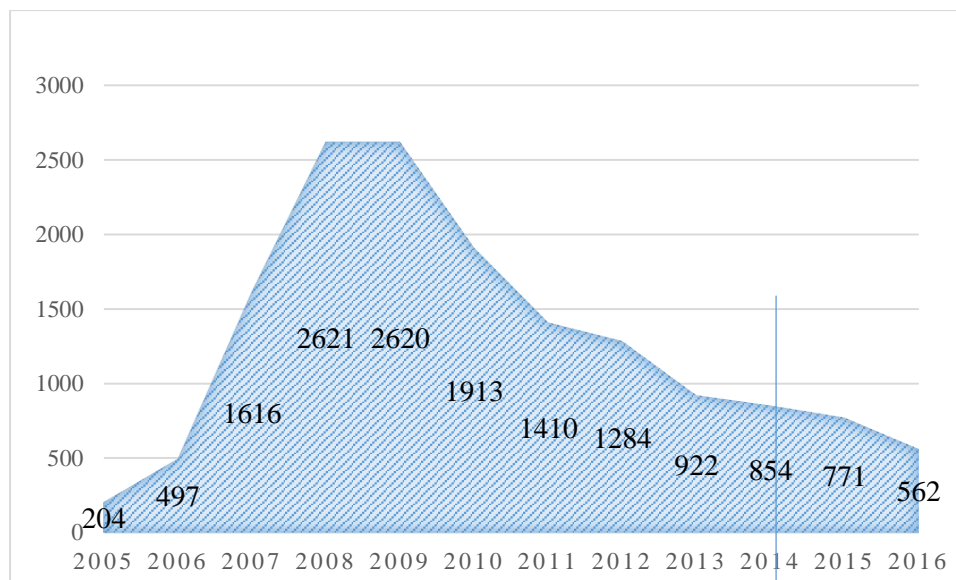
Сравняват се и се предлагат максимално ефективни подходи при използване на наличната софтуерна програма като анализът на резултатите няма за цел коментирането на възможностите на софтуера и методите за изчисление. Акцентите са върху характеристиката на изследваните жени - брой, възраст, чувствителност на изследването, коментар на отделните случаи и ролята на МГК.

#### 1.1. Резултати и обсъждане от късен биохимичен скрининг

##### 1.1.1. Характеристика на групата жени, провели BXC2

Общият брой жени, провели *само* късен скрининг (BXC2) в ЛМГВ за изследвания период (2005-2014), е **13 924**. След въвеждане на теста се наблюдава ежегодно и бързо нарастване броя на проведените изследвания до 2008 г., когато се достига максимален брой - 2 623 (Фиг.1). След първоначалния пик се наблюдава двукратен спад (2010 г.), когато се въвежда по-чувствителният ранен комбиниран тест. Регресивната устойчива тенденция е в унисон със световните тенденции (Gyselaers W, 2004) и продължава, по наши наблюдения, и през последващите две години, макар извън обхвата на проучването (отчети за 2015 и 2016).

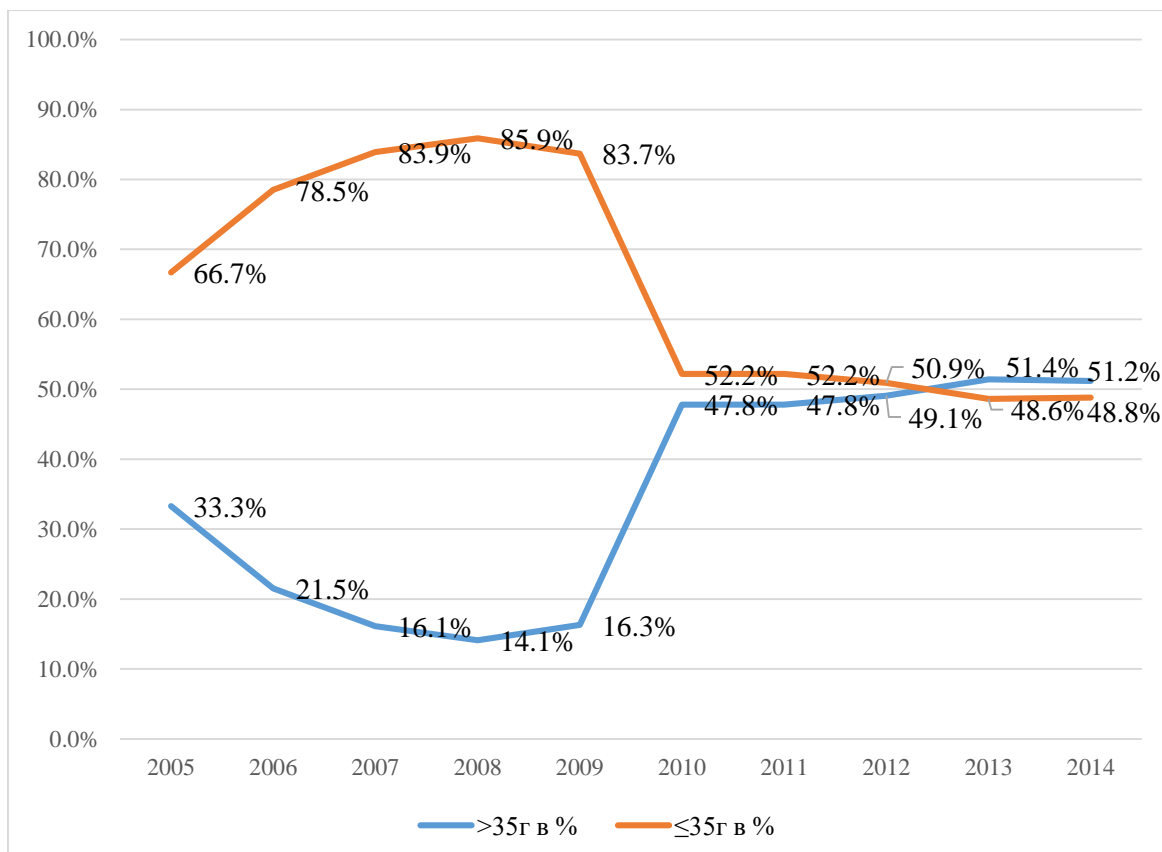




*Фигура 1. Брой жени, провели БХС2 за период 2005-2016 г.*

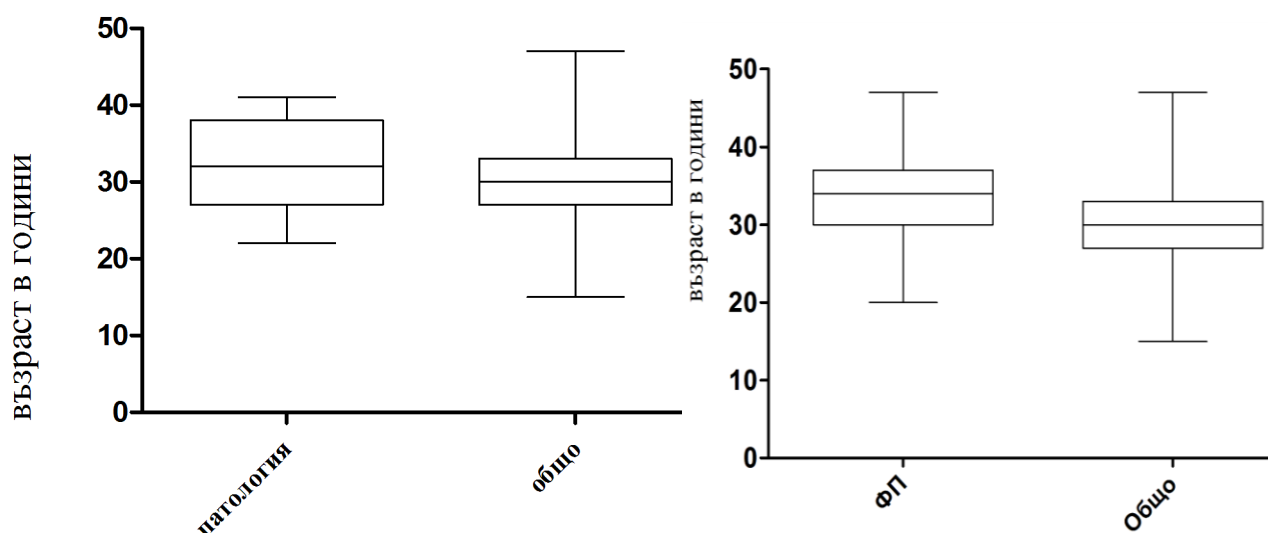
За да се намали драстично броят на инвазивните диагностични процедури (АЦ, ХБ) при жени с повишен възрастов риск, методичните указания за фетална диагностика и оценка на риска (от 2003 г.), насочват към активно предлагане при тях на скрининг, базиран на биохимични и/или УЗ маркери в съчетание с майчината възраст. Самостоятелно, до тогава, майчината възраст показва чувствителност от 30%, при ФП резултатите от 5%. Той обаче цели именно групата на жени под 35 години, с тенденция към масово приложение, а не се ограничава по възрастово показание.

Наблюдава се значителна разлика в броя жени по възраст (над и под 35 г.), провели БХС2. Средно два пъти повече са тези под 35 г. (69%), като в началото на изследвания период те са 66.7%, сравнено с 33.3% за жени над 35 г. Известно е, че въпреки пряката корелация между майчина възраст и бройни хромозомни болести по-големият процент анеуплоидии се открива при жени под 35-годишна възраст. Тази тенденция се променя постепенно, като 2014 г. възрастовите категории се изравняват, вероятно поради цялостния спад на интереса към провеждане на късен скрининг (Фиг. 2).



Фигура 2. Разпределение в проценти на жени над и под 35 г., провели БХС2 за период 2005-2014 г.

**Средна майчина** възраст на бременни, изследвани с БХС2 е 30.1 г. (SD 4.8). Наблюдава се сравнително постоянство в годините на отчетния период – тя варира между 29 г. и 31 г. Установява се обаче, че при жени с фетус с потвърдена хромозомна болест средната възраст е по-висока - 32.95 г. (SD 6.152  $p=0.0650$ ), много близо до сигнификантна стойност. Средната възраст при жени с ФП резултати е сигнификантно по-висока от средната възраст при всички изследвани ( $p<0.0001$ ) (Фиг. 3). Обяснението на този факт се намира в голямата тежест на възрастовия фактор в общата оценка на риска при БХС2.



Фигура 3. а) Средна възраст (СВ) на жени с патология спрямо СВ на всички изследвани; б) СВ на жени с ФП резултати спрямо СВ на всички изследвани

Таблица 2. Средна възраст на майката и средна гестационна възраст на плода при провеждане на изследването с данни за стандартно отклонение (SD) при описаните категории бременности

Категория	Общо	Общо доказана хромозомна патология	ФП	ФН	„Уловена“ патология
Брой	13 924	21	1 200	11	10
Средна възраст	30.1	33	33.3	31.1	32
SD	4.8	6.2	5	5.5	6.7
Средна ГВ	16.3	16.2	16.1	15.9	15.7
SD	1.1	1.5	1.3	1.1	0.8

Средните стойности на ГВ за всички случаи с верифицирана диагноза е 16.3 г.с. (Таблица 2). Тя показва, че масовото насочване към изследването в периода на 16 г.с. дава възможност за оценка на ДНТ и коремна стена. В същото време срокът е адекватен за предприемане на инвазивна манипулация в случай на нужда. **Не се открива статистически значима разлика между средните стойности на ГВ за групата жени с патология спрямо всички**

изследвани жени ( $p=0.662$ ), както и тези с изчислен ФН и ФП резултат (съответно  $p = 0.622$  и  $p = 0.806$ ).

### 1.1.2. Разпределение на изследваната група по рискови категории

Данните относно разпределението на изчислените рискове в различните подгрупи от изследваните общо 13 924 жени са представени в Таблица 3. Изчисленият риск е представен в две категории съобразно неговата величина (нисък и висок) и възрастов фактор. От общо 13 924 жени, провели късен скрининг, 1 210 (**8.7%**) са показали повишен риск (13.1% за 2016 г. от цялата страна съобщава А. Савов,), предимно в групата на жени над 35 г. (**60.5%**). Данните съобщени от В. Димитрова за 2002 са 31.7% ФП резултати при жени над 35 г., спрямо 6.6% за жени под 35 г. Включването на възрастовия фактор в общата оценка на риска оказва своята тежест, което води до висок процент ФП резултати, докато диагностицираните пре- или постнатални анеуплоидии са в по-висок процент сред млади жени, в 14 от 21 (66.7%) общо за разкритата патология (Таблица 4 по-долу).

*Таблица 3. Разпределение на жените, провели БХС2 по рискови категории и възраст*

Стойност на риска	Жени > 35		Жени ≤ 35		Общо	
<b>Висок риск със стойност ≤1/250 за T21 и T18</b>	732	<b>60.5%</b>	478	39.5%	<b>1210</b>	<b>8.7%</b>
<b>Нисък риск със стойност &gt;1/250</b>	3628	28.5%	9086	71.5%	12 714	91.3%
<b>Общо</b>	4 360	31.3%	9564	68.7%	<b>13 924</b>	100%

Известно е, че самостоятелно провежданият късен скрининг е с най-ниска чувствителност (около 60%), въпреки това той не е отричан. Препоръчва се да бъде предлаган, когато жената е насочена късно. В тези случаи МГК следва да предложи проследяване от специалист по фетална морфология и неинвазивно генетично изследване или обсъди инвазивна диагностична процедура при показание.

### 1.1.3. Принос на БХС2 за разкриване на хромозомни анеуплоидии

Документалният метод ни дава възможност за разкриване на **21** (0.2%) случая с хромозомна аномалия, пре- или постнатално верифицирани сред контингента от 13 924 пациенти, провели БХС2. Информацията със стойностите на маркерите в плода и изхода от бременността са представени в Таблица 4.

Таблица 4. Случаи с пре- и постнатално верифицирана диагноза след проведен БХС2

№	Възраст	г.с.	Риск от БХС2	h AFP MoM	free βhCG MoM	uE 3	А Ц	Изход от бременността
1	27	16	1 от 25	0.5	3.9		Да	Аборт на фетус с 46,XX, dup(Xp)
2	29	15.6	1 от 118	0.7	4.13		Да	Аборт на фетус T21
3	40	17.3	1 от 34	1.19	6.51		Да	Аборт на фетус с T21
4	39	15	1 от 7	0.4	2.51		Да	Аборт на фетус с T21
5	35	15.3	1 от 140	0.73	2.02	-	Да	Аборт на фетус с T21
6	22	15.3	1 от 35	0.54	5.04	0.8	Да	Аборт на фетус с T21 46,XY,t(14;21)+21
7	41		1 от 94	0.69	0.91		Не	Родено дете с T21
8	30	15.6	1 от 220	0.59	2.01		Не	Родено дете с T21
9	40	16.6	1 от 5	0.36	3.02		Не	Родено дете с T21 mos T21
10	26	15	1 от 65	0.81	4.82	0.8 3	Не	Родено дете с T21
11	37	15.5	1 от 2586 за T21;	<0.5	0.08		Да	Фалшиво (-) Аборт на фетус с T18
12	27	15.5	1 от 3581 за T21	0.53	0.01		Да	Фалшиво (-) Аборт на фетус с 69, XXX
13	22	15.6	1 от 340	0.99	3.81		Да	Фалшиво (-) Аборт на фетус с T21
14	32	19.6	1 от 2150	1.53	1.74		Не	Фалшиво (-) родено дете с T21
15	32	16.2	1 от 475	0.54	1.21		Не	Фалшиво (-) родено дете с T21
16	23	15.2	1 от 340	0.3	1.31		Не	Фалшиво (-)

								родено дете с T21
17	31	17	1 от 1100	1.12	0.68		He	Фалшиво (-) родено дете с T21
18	32	16.4	1 от 2100	0.72	0.76		He	Фалшиво (-) родено дете с T21
19	40	14.6	1 от 530	0.94	0.97		He	Фалшиво (-) родено дете с T21
20	36	18	1 от 610	0.44	0.46	0.9 5	He	Фалшиво (-) родено дете с T21
21	30	15	1 от 3800 за T21; 1 от 730 за T18	0.22	0.57		He	Фалшиво (-) родено дете с T18

В тях влизат 10 (**47.6%**) случая, показали повишен риск за хромозомна болест и препоръчана пренатална диагностика (**№1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10**). След амниоцентеза, проведена в 6 от тях (28.6% от верифицираните диагнози), се диагностицират 5 случая с тризомия 21 (**№2, 3, 4, 5, 6**) (в т.ч. транслокационна форма 46,XY,t(14;21)(q10;q10)+21) (**№6**) и 1 с пълна дупликация по късото рамо на X-хромозома (**№1**). В 4 случая пренатална диагностика не е проведена (**№7, 8, 9, 10**) и постнатално е установена T21, в т.ч. един мозаечен вариант. В тези случаи са „изпуснати“ поради неявяване на майката за получаване на резултат с писмено заключение от генетичната консултация и/или непровеждане на амниоцентеза поради „успокоение“ след УЗ преглед, че няма маркери за T21. Вероятно се касае за психологическа тенденция при бременни да търсят активно „добрия“ резултат, по подобие на нерядко желаещите жени с висок риск за повторение на анализа (биохимичен или УЗ). Това показва същественият роля на генетичната консултация, въпреки че е недирективна, тя цели поясняване възможностите и ограниченията на всеки метод. Ролята на МГК при получаване на резултат с висок риск е съществена за последващото поведение, но при разнопосочни резултати МГК се затруднява значително.

Успех в крайната цел за генетична профилактика представлява анализът на 3 от 21 случая (**№11, 12 и 13**), при които се препоръча и провежда амниоцентеза с последващ аборт по медицински показания, въпреки ниските биохимични рискове. В един от случаите (**№12**) се разкрива триплоидия, което показва неспецифичност на хромозомните аномалии при изследване на хормонални маркери, подобно на находката в случай **№1**. Компетентното разчитане на биохимичните показатели от лабораторно квалифициран консултант се оказва от съществено значение за алгоритъма на поведение за генетична превенция. Заедно с тези три „разкрити“ засегнати фетуса

чувствителността на късния скрининг би се повишила на **61.9% в рамките на нормата на цитираните по литературни данни 60-65%.**

Категорично фалшиво отрицателни („изпуснати“) случаи се разкриват в 8 от 21 (38.1%) бременности с верифицирана хромозомна патология. Това са 7 случая на новородени със синдром на Даун (**№14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20**) и 1 със синдром на Едвардс (**№21**). Във всички тези случаи пациентката е провеждала специализирано УЗ изследване за „фетална морфология“ без диагностициране на маркери за хромозомна патология.

На Таблица 5 са представени изчисления при различни гранични стойности, подбрани на база цитираните в литературата и спрямо наличните данни за патологични резултати. Изчисляване на гранични стойности при фиксиран процент ФП стойности или чувствителност не би било оптимално поради значителни различия в наличните и очаквани резултати. Като най-показателна и информативна за чувствителност за T21, по препоръка на ISPD, се приема позитивната предиктивна стойност (ППС) на скрининговия тест, изчислена от реално позитивните резултати, разделени на сбора от реално позитивните и фалшиво позитивните резултати. При прилагания от нас cut off 1/250 ППС са ниски поради висок брой ФП резултати. Опит за снижаване на cut off 1/200 води до намаляване на ФП, но и намаляване на чувствителността на 42.9%.

*Таблица 5. Количествени показатели за ефективност на БХС2 при cut off 1/200, 1/250, 1/350; РП - реално позитивни, ФП - фалшиво позитивни, ФО - фалшиво отрицателни*

БХС2	Чувствителност = РП/РП+ФО	Специфичност = РО/РО+ФО	позитивна предиктивна стойност = РП/РП+ФП	ФП %	ФО %
<b>cut off 1/200</b>	42.9%	93.8%	1 %	6.2%	57.1%
<b>cut off 1/250</b>	<b>47.6%</b>	<b>91.4%</b>	<b>0.8%</b>	<b>8.6%</b>	<b>52.4%</b>
<b>cut off 1/350</b>	57.1%	88.5%	0.8%	11.5%	42.9%

При cut off 1/350 ППС е същата, чувствителността е най-висока 57.1%, но това е за сметка на неприемливо високи ФП резултати 11.5%.

#### 1.1.4. Анализ на биохимичните показатели

За оценка на информативността на отделните биохимични показатели, изследвани при провеждане на БХС2, е приложен ROC анализ. Групата на бременности с патология Т21 (тъй като при другите тризомии броят на патологията е твърде малък) е сравнена с бременности без патология в същата гестационна седмица.

По отношение на Т21 free  $\beta$ hCG коефициентът area under curve (AUC) е с най-високи стойности 0.834 в 15 г.с., а AFP AUC в 18 г.с. и 15 г.с. - съответно 0.964 и 0.687. Стандартно се приема, че колкото по-близо до 1.0 е резултатът, толкова по-високо информативен е маркерът, като стойностите му варират между 0.5 и 1.0. Въпреки че групата на бременности с патология е малка, от анализирания данни следва, че **БХС2, провеждан в 15 г.с. би бил максимално информативен, като в допълнение носи позитивите на ранната информираност.**

#### 1.1.5. Ролята на БХС2 за разкриване на вродени аномалии – ДНТ, предна коремна стена

*Провеждането на късен биохимичен скрининг дава допълнителна възможност за оценка на риск за дефект на невралната тръба (ДНТ) или коремната стена на база нивата на изследвания AFP. Завишени нива на хормона, със съответно изчислен висок риск за анализирания период 2005-2014 г., се наблюдават при 55 (0.4%) бременни.*

При честота приблизително 1 на 1000 за ДНТ за изследвани 13 924 жени очакваната патология възлиза на 14 случая. Ние разполагаме с информация за 5 (35.7% от очакваните) случая с дефекти на невралната тръба. Това би могло да се обясни с по-ранната УЗ възможност да се установят тези аномалии и вероятно непровеждане на БХС2 от тези жени.

В други 3 случая бременността завършва със загуба на плода, 1 – усложнено раждане с плацента превия, 1 – преждевременно раждане, 1 – раждане на дете с хидроцефалия. Доколко тези усложнения, извън търсената патология, са свързани с отклоненията в AFP, е трудно да се коментира поради малкия брой. Има съобщения в литературата, които включват малки за гестационната възраст новородени, усложнено раждане, фетални малформации и др. (Димитрова В, 2002; Gagnon A, 2008).

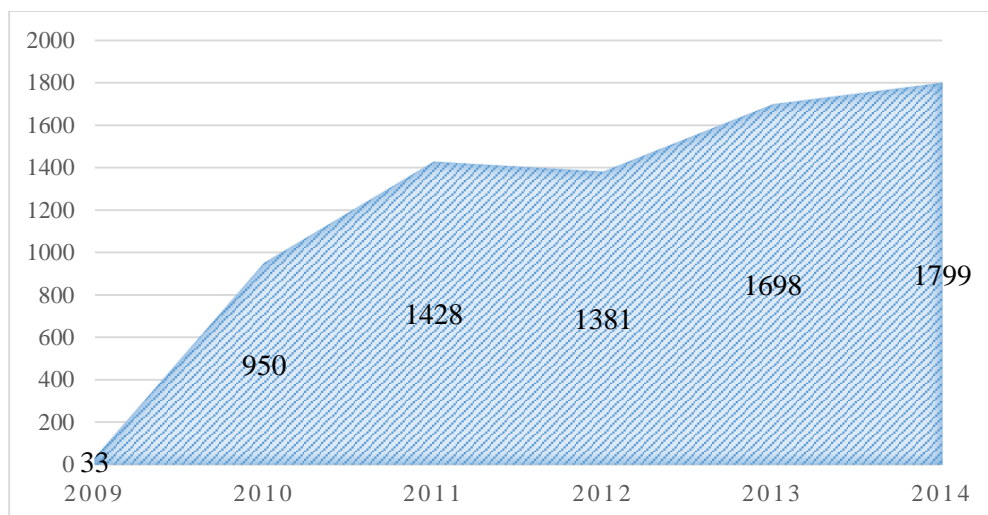
**На база коментирания резултати се потвърждава широко приетата практика ултразвуковата диагностика “фетална морфология“, проведена 19-22 г.с. да е основен метод за верификация на вродени аномалии като ДНТ и коремна стена.**



## 1.2. Резултати и обсъждане на ранен комбиниран скрининг

### 1.2.1. Характеристика на групата жени, провели КБХС1

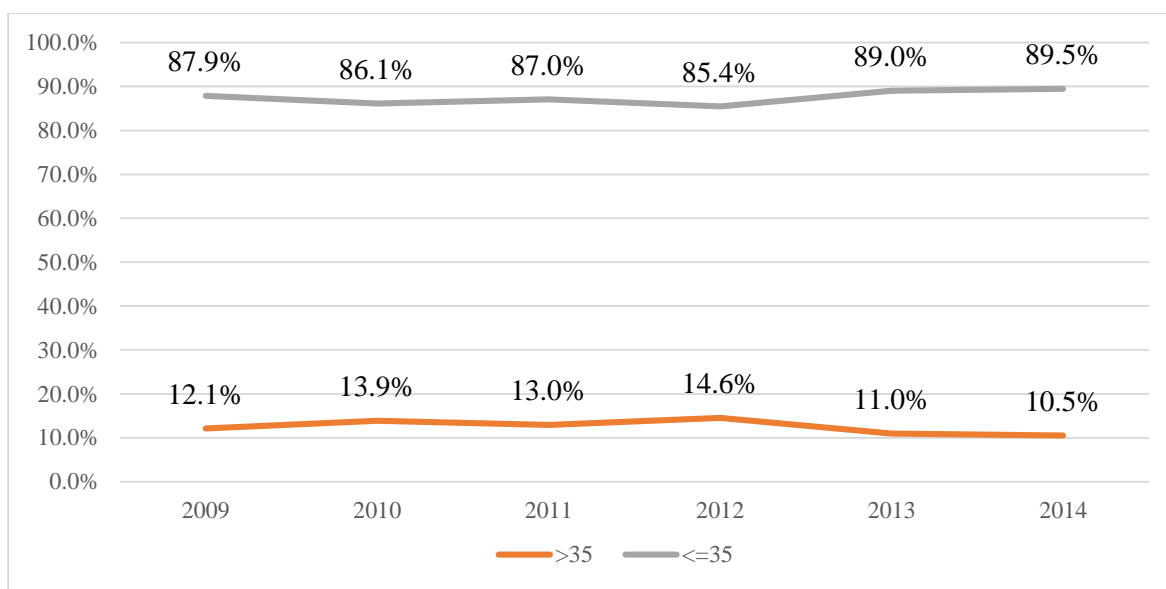
Общият брой жени, провели КБХС1 в ЛМГВ, е 8 915. От тях **7 303** (81.9%) бременни са провели само ранен генетичен тест без последващ БХС2. Наблюдава се непрекъснато нарастване на броя проведени КБХС1 – от 33 до 1799 на година (593%), като тази тенденция запазва устойчивост, по наши наблюдения, за последващите две години, макар и извън обхвата на проучването (отчети за 2015 и 2016) (Фиг. 4).



*Фигура 4. Брой жени, провели само КБХС1 за периода 2009-2014 г.*

Това е показател за популяризирането на скрининговата програма и е в унисон с общата тенденция в национален и международен мащаб. По данни на А. Савов, 2017, се отчита общо увеличение с около 8% за 2016 г., като особено значимо е нарастването на скрининга в първи триместър.

Наблюдава се устойчиво постоянство в съотношението на брой бременни над и под 35 г. (Фиг. 5). За периода 2009-2014 г. 13% са жени над 35 г., а останалите 87% - под 35 г.

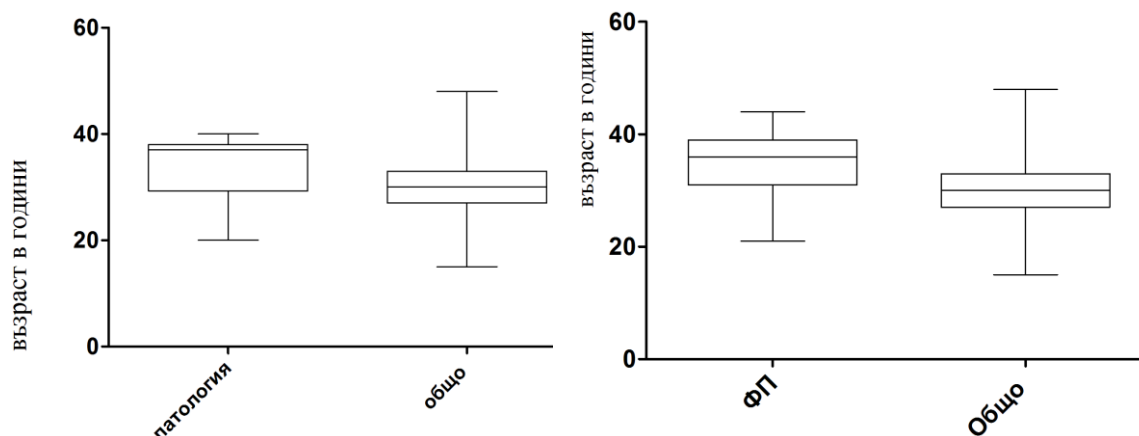


Фигура 5. Разпределение на жени над и под 35 г. в проценти, провели КНХС1 за период 2009-2014 г.

Средна възраст за всички 7 303 жени е **29.9 г.** (SD 4.60) (Таблица 6). Средната възраст на жените с потвърдена хромозомна патология при плода (**34.25 г.**) е значимо по-висока ( $p=0.0002$ ) от средната възраст на всички изследвани (Фиг. 6а). Аналогично на БХС2 и тук ФП резултати се наблюдават в значимо по-висока степен сред по-възрастни бременни, сравнено с групата на всички, провели КБХС1 ( $p<0.0001$ ) (Фиг. 6б).

Таблица 6. Средна възраст на майката при провеждане на изследването с данни за стандартно отклонение (SD) при описаните категории бременности

Категория	Общо	Общо доказана хромозомна патология	ФП	ФН	“Уловена“ патология
Изследвани чрез КБХС1 (брой)	7 303	15	108	6	9
Средна възраст (в години)	29.9	34.3	35.1	31.8	35.4
SD	4.6	5.92	4.97	8.11	4.1



Фигура 6 а) Средна възраст (СВ) на жени с патология спрямо СВ на всички изследвани; б) СВ на жени с ФП резултати спрямо СВ на всички изследвани

По литературни данни съществуват различия по отношение на представянето на КБХС1 в зависимост от точния срок на провеждането му в периода 11-14 гестационна седмица, която се изчислява на база стойността на CRL. Проучвания препоръчват 12 г.с. като най-подходяща за биохимичен анализ (ISPD). На Таблица 7 са представени средните стойности на CRL общо за всички, провели КБХС1, за всички с доказана и разкрита хромозомна патология, както и на тези с ФП, ФН резултати. Бременните са провели КБХС1 в рамките на три дни от УЗ прегледа, т.е. средно CRL 58.69 мм, съответстващ на 12+3 г.с. +/- 3 дни.

Таблица 7. Средна стойност на CRL в мм при провеждане на изследването с данни за стандартно отклонение (SD) при описаните категории бременности

Категория	Общо	Общо доказана хромозомна патология	ФП (cut off 1/250)	ФН	“Уловена“ патология
Брой изследвани	7 303	15	108	6	9
Средна стойност на CRL в мм	58.7	57.1	57	55.3	58.2
SD	8.94	8.86	10.61	6.58	10.32

Не се открива статистически значима разлика между средните стойности за групата жени с патология спрямо жени с ФН и ФП резултати (съответно  $p=0.557$  и  $p=0.771$ ). CRL маркерът е от значение сам по себе си за определяне срока на бременността в рамките на контролните стойности на

гестационната възраст. Извън това обаче не трябва да се забравя, че съществува значима корелационна зависимост на стойностите на друг УЗ маркер НТ спрямо гестационната възраст, т.е. стойността на **CRL**. Тази корелация налага да се отчете условността на популационно приетата според някои нормална стойност за НТ < 2.5 мм.

### 1.2.2. Разпределение на изследваната група по рискови категории

Данните относно разпределението на **изчислените рискове** в различните подгрупи от изследваните общо 7 303 бременни за период от 2009-2014 са представени в Таблица 8.

Изчисленият риск е групитан в 3 категории съобразно неговата величина и майчината възраст. Междинният риск е обобщен в две подразделения – без оглед данните от биохимичните маркери и с повишен риск от биохимични маркери дори и при нисък краен риск. **В групата на жени над 35 години е изчислен висок риск в 52.1%, с междинен риск в 52.5%, което е аналогично на резултатите от БХС2.** Въпреки това диагностицираните преди или постнатално анеуплоидии са в по-висок процент сред жени над 35 г. в 72.72% общо за Т21,Т18, Т13 и 60% само по отношение на Т21 (виж по-долу).

Таблица 8. Разпределение на жените, провели БХС2 по рискови категории и възраст

Категория рискове	Жени ≤ 35 г.		Жени > 35 г.		Общо		Препоръка за поведение
<b>Висок риск</b> - стойност ≤ 1/250	<b>56</b>	<b>47.9%</b>	<b>61</b>	<b>52.1%</b>	<b>117</b>	<b>1.6%</b>	АЦ
<b>Междинен риск – ОБЩО</b> 1/250 до 1/1000	<b>207</b>	<b>47.5%</b>	<b>229</b>	<b>52.5%</b>	<b>436</b>	<b>6%</b>	БХС2
• без значение на БХ риск	103	55.4%	83	44.6%	186	2.6%	
• с повишен <b>БХ риск</b> , при нисък комбиниран риск	104	41.6%	146	58.4%	250	3.4%	
<b>Нисък риск</b> - стойност > 1/1000 и без отклонения в БХ риск	<b>6 089</b>	<b>90.2%</b>	<b>661</b>	<b>9.8%</b>	<b>6 750</b>	<b>92.4%</b>	Не се предлага последващ тест
<b>Общо</b>	<b>6 352</b>	<b>87%</b>	<b>951</b>	<b>13%</b>	<b>7 303</b>		

Заложеният в софтуерната програма за КБХС1 cut off е 1/250 за T21 и 1/100 за T18 и T13. Генетичното консултиране в ЛМГВ прилага подход на контингентен скрининг, разделяйки рисковете на три групи. Наблюдаваните от нас резултати показват, че няма разкрита патология с T18 и T13 с риск между 1/100 и 1/250 - т.е. всички са с подчертано високи рискове, затова сме приели следното класиране на резултатите: „нисък” - с комбиниран риск по-нисък от 1/1 000 и без отклонение в биохимичния риск, „висок” - с комбиниран риск над 1/250 за всички тризомии, „междинен” – комбиниран риск между 1/250 и 1/1 000 и/или самостоятелно повишен биохимичен риск при нисък комбиниран риск. След въвеждането на ранния генетичен тест БХС2 се предлага само на жени, пропуснали срока за изследване, такива, които попадат в междинната категория (контингентен скрининг), и такива, които независимо от ниския риск от КБХС1 желаят и късен за получаване на интегрирана оценка на риска.

От общо 7 303 жени, провели ранен скрининг, 117 бременни (**1.6%**) са показали висок риск за T21 (2.3% за 2016 при 17 533 съобщава А. Савов). Това са 61 жени (52.1%) > 35 год. и 56 жени (47.9%) ≤ 35 год. Всички жени с повишен риск за T21 включват и повишените рискове над 1/100 за T18, T13, т.е. не се открива самостоятелно повишен риск за друга хромозомна анеуплоидия, без да има повишен риск за T21, въпреки че обратната корелация не е валидна. Невинаги повишен риск за T21 се асоциират с повишен риск за другите анеуплоидии. Поради това при последващите изчисления се акцентира върху висок риск за T21.

Самостоятелно повишен биохимичен риск с нисък комбиниран риск е намерен при 250 жени от общо 436 с *междинен риск* (57.3%) и именно в тази категория попадат три от фалшиво отрицателните случаи, понижаващи чувствителността на изследването (виж Таблица 8).

### **1.2.3. Принос на КБХС1 за разкриване на хромозомни анеуплоидии**

Документалният метод ни дава възможност за разкриване на **15 (0.2%)** случая за хромозомна болест, пре- и постнатално верифицирани сред контингента от 7 303 жени, провели само КБХС1. Информацията със стойностите на маркерите в плода и изхода на бременността са представени в Таблица 9.

Таблица 9. Случаи с пре- и постнатално верифицирана диагноза след проведен КБХСІ

№	В ъз р ас т	комбини- ран риск	биохим ичен риск	PAP P-A Мо М	free βhC G Мо М	НТ мм	НТ МоМ	CRL	НК	АЦ	Изход от бременността
1	26	1 от 5 за T21; 1 от 5 за T13	1 от 460	<0.2	<0.5	8.44		67.9	няма данни	Да	Аборт на фетус T13
2	40	1 от 15	1 от 75	1.02	1.88	2.6	1.77	56.4	няма данни	Да	Аборт на фетус T21
3	38	1 от 5	1 от 290	0.44	0.84	4.7	2.69	79	няма данни	Да	Аборт на фетус T21
4	33	1 от 5	1 от 80	0.65	3.78	3.8	2.46	60.1	няма данни	Да	Аборт на фетус T21
5	37	1 от 80	1 от 710	0.59	0.76	3	1.9	62	да	Да	Аборт на фетус T21
6	34	1 от 5 за T21; 1 от 9 за T18	1 от 200	0.15	0.54	6	4.78	47.9	не	Да	Аборт на фетус T18
7	37	1 от 60 за T21; 1 от 20 за T18	1 от 230	0.2	0.03	2.4	1.84	49.6	да	да	Аборт на фетус T18
8	37	1 от 15	1 от 3100	0.9	0.4	7.4	5.42	51.9	не	Да	Аборт на фетус T21
9	38	1 от 15	1 от 5	0.17	3.96	1.4	1.09	49	няма данни	не	Родено дете с T21
10	40	1 от 730	1 от 70	1.14	2.55	0.8	0.56	55	да	не	фалшиво (-) родено дете с T21
11	40	1 от 2000	1 от 310	0.36	0.38	0.9	0.61	56.4	да	не	фалшиво (-) родено дете с T21
12	36	1 от 1600	1 от 300	1.26	1.27	2	1.18		няма данни	не	фалшиво (-) родено дете с T21
13	28	1 от 2400	1от 100	0.13	1.23	0.6	0.47	48.5	да	не	фалшиво (-) родено дете с T21
14	27	1 от 1600	1 от 1800	0.45	0.69	2.4	1,83	49.9	да	не	фалшиво (-) родено дете с T21
15	20	1 от 54 000 за T21; 1 от 100 000 за T13	1 от 20 000	0.56	0.31	1.91	1.15	67.13	да	не	фалшиво (-), родено дете с T13

От тях **9 (60%)** са показали повишен риск за хромозомна болест и е препоръчана пренатална диагностика (**№1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9**). След амниоцентеза, проведена в 8 от случаите (53.3% от верифицираните диагнози), се диагностицират следните случаи с хромозомна болест - 5 с T21 (**№2, 3, 4, 5, 8, 9**), 2 с T18 (**№6, 7**) и 1 с T13 (**№1**) (Таблица 9). Прави впечатление в тези случаи с T13 и T18, че има отчетливо високи рискове, много по-високи от 1 на 100. В случай **№1** не е провеждана АЦ въпреки отчетливо високия риск и се ражда дете с T21.

В общо **6 от 15 (40 %)** бременности с верифицирана хромозомна патология се касае за „изпуснати“ случаи - *фалшиво отрицателни*. Това са 5 случая с тризомия 21 (**№10, 11, 12, 13, 14**) и 1 случай с тризомия 13 (**№15**). От тях само в **№14** и **15** няма размърдване в показателите - било то биохимични, УЗ или крайна оценка на риска.

Особено внимание за анализ при ФО резултати заслужава категорията *„междинни рискове“*. От таблицата е видно, че в 4 от 6 случая се касае за висок биохимичен риск, но нисък комбиниран ранен риск. В случаи **№10** и **13** рисковете от биохимичен риск са повишени (1 на 70 и 1 на 100), което е извело необходимост от препоръка за провеждане и на късен скрининг с изчисляване на интегриран риск. Не можем да кажем дали това би довело до разкриване на хромозомната болест (повишен ИР и препоръка за АЦ), но **алгоритъмът на поведение не е спазен**, поради което тези два случая биха могли да се причислят към т.нар. „изпуснати“ случаи, т.е. скринингът не е постигнал своята цел. Анализ на случай **№13**, при който резултатът с повишения биохимичен риск 1/100 е получен онлайн без МГК, алармира за дефицит в информацията, достигаща до бременната. Това налага през 2012 г. ЛМГВ да въведе допълнителна графа в онлайн варианта на резултата за бременната като коментар с препоръка за поведение. При повишени или междинни рискове, както и тълкуване на всички маркери в резултата извън общата оценка на риска от специалист генетик, анализирал резултата. В случаи **№11** и **12 биохимичните** рискове самостоятелно отново са близки до граничната стойност (1/310 и 1/300). Предвид възрастта на бременните (40 г. и 36 г.) би могло да се отсъди в полза на квалифицирано генетично консултиране и наложителни последващи изследвания, предвид високата стойност от 2.4 мм на НТ, съотнесено към CRL. Във всички тези 4 случая с междинен риск от биохимични показатели информацията за наличие на носни кости е подвеждаща. Това снижава, в крайна сметка, комбинирания риск до нисък.

По-широкообхватният алгоритъм на поведение при междинен риск би бил препоръка за интегриран риск не само при висок биохимичен риск, а и при

междинни рискове + тези с изолирано висок биохимичен риск, тъй като в тях не влиза оценката на допълнителни маркери (възраст и ехографски показатели). В случай №3 биохимичният риск остава в рамките на ниския риск 1/290, но общата оценка на риска е 1/5 поради ехографски данни (НТ 4.7 мм). Следва препоръка за АЦ и пренатално диагностициран плод с Т21. Това се потвърждава и от случай №10, при който биохимичният риск е 1/310, няма отклонения в ехографските параметри и въпреки възрастта (39 г., възрастов риск 1/100) общата оценка на риска остава ниска 1/1000, което води до ФО резултат за Т21.

На Таблица 10 са представени изчисления при различни гранични стойности, подбрани на база цитираните в литературата и спрямо наличните данни за патологични резултати. При cut off 1/50 има най-нисък процент ФП 0.6% (значимо под цитираните в литературата около 5%), но най-високи ФО стойности - 43.8% сравнено с 40% при cut off 1/100. При наличните данни за отчетливо повишен риск при жени с верифицирана диагноза, приемане по-нисък cut off от 1 на 250, например 1 на 100, би довел до намаляне на ФП резултати от 1.5% на 1.2%. Такъв подход с ниски стойности за граница и последващ НЕГИ за по-широка група от бременни с междинни рискове, би довел до добра ефективност като минимизира броя проведени АЦ от една страна, от друга не предлага НЕГИ на първа стъпка, което е финансово по-изгодно.

Изследване на допълнително 945 бременни с междинни рискове повишава откриваемостта на патология (чувствителност 65.4%, ФО спадат на 34.6%), но значимо се повишават ФП резултати от 1.5% на 7.1%.

*Таблица 10. Количествени показатели за ефективност на КБХС1 при cut off 1/50, 1/100, 1/250; РП - реално позитивни, ФП - фалшиво позитивни, ФО - фалшиво отрицателни; \* при контингентен подход с препоръка за БХС2 и ИР на жени с междинен резултат от КБХС1*

КБХС1	Чувствителност РП/РП+ФО	Специфичност РО/РО+ФО	позитивна предиктивна стойност = РП/РП+ФП	ФП %	ФО %
cut off 1/50	56.3%	99.4%	16.4%	0.6%	43.8%
cut off 1/100	60%	98.8%	9.5%	1.2%	40%
cut off 1/250	60%	98.5%	7.7%	1.5%	40%
*cut off 1/100 + междинни (100-1000) + висок БС	65.4%	92.9%	3.0%	7.1%	34.6%



Въпреки предимството на гранични стойности от 1 на 100 броят на патологията не е достатъчно голям, за да се дефинира конкретна цифра за оптимална без риск за пропускане на бъдещи патологични бременности с граничен резултат. Изчисленията са направени на база наличната разкрита хромозомна патология (T21, T18, T13, монозомия X, неспецифична хромозомна патология), с един и същ cut off за всички състояния. Липсват конкретни изчисления за финансовото измерение на ползите от предложените алгоритми, но изборът на оптимален cut off би спестил ненужни диагностични процедури. Въпреки това тя остава математически подбрано число и при МГК трябва да се имат предвид всички други субективни съображения.

От диагностицираните пре- и постнатално анеуплоидии 6 от 15 (40%) са при жени под 35 г., а останалите 9 (60%) - над 35 г. По отношение на T21 три от 11 (21.2%) при жени под 35 г., а 8 (72.7%) - при жени над 35 г. По един случай на T18 и в двете възрастови групи, а двата случая на T13 са при бременни на 20 г. и 26 г.

В 3 от 6 случая на ФО резултати се касае за жени над 35 г., в тези случаи възрастовата индикация за диагностична процедура би уловила наличието на хромозомна болест. При други 661 (жени над 35 г. с нисък риск) спазването на утвърдения алгоритъм спестява психологичния дискомфорт, не подлага на допълнителен риск и спестява скъпа високоспециализирана манипулация. Възрастовият риск и решението да се предприеме или не инвазивна процедура има алтернатива с навлизането на новите НЕГИ тестове.

#### **1.2.4. Анализ на биохимичните показатели**

В 2 (№10 и 13) от 6 случая с ФО резултат се наблюдава завишен биохимичен риск самостоятелно без висок риск от общата оценка. В тези случаи следва да бъдат препоръчани БХС2 за изчисляване на ИР за постигане на по-висока чувствителност. Доброто разчитане на риск само от биохимични маркери и правилното им анализиране (отразявани в резултатите като „Допълнителна информация за консултиращия лекар“) имат за цел да насочат към контингентен скрининг с интегрирана оценка на риска, което се пропуска в някои случаи при получен онлайн резултат или липса на коментар от насочващия специалист.

За оптимизиране на МГК при резултат с отклонения са предприети следните действия:

- препоръка за получаване на резултат от ЛМГ;

- МГК + писмен коментар от консултиращия лекар;
- вписване на коментар в резултат за бременни, получаващи резултат чрез онлайн платформа на НГЛ.

За оценка на информативността на отделните биохимични показатели, изследвани при провеждане на КБХС1, е проведен ROC анализ. Групата на бременности с патология Т21 (единствената достатъчно голяма група) е сравнена с бременности без патология, в същата гестационна седмица.

AUC коефициентът за информативността на PAPPA и Free $\beta$  hCG е изчислен за 11 и 12 г.с., тъй като са налични данни само за един случай в 13 г.с. От анализа следва, че **при разкриване на Т21 чрез КБХС1 по-чувствителен е PAPPA**, при това **измерен в 11 г.с.** (AUC 0.854). Free  $\beta$ hCG се представя по-добре (AUC 0.633) в 12 г.с.

### 1.2.5. Ролята на специализирания УЗ преглед за „фетална анатомия“

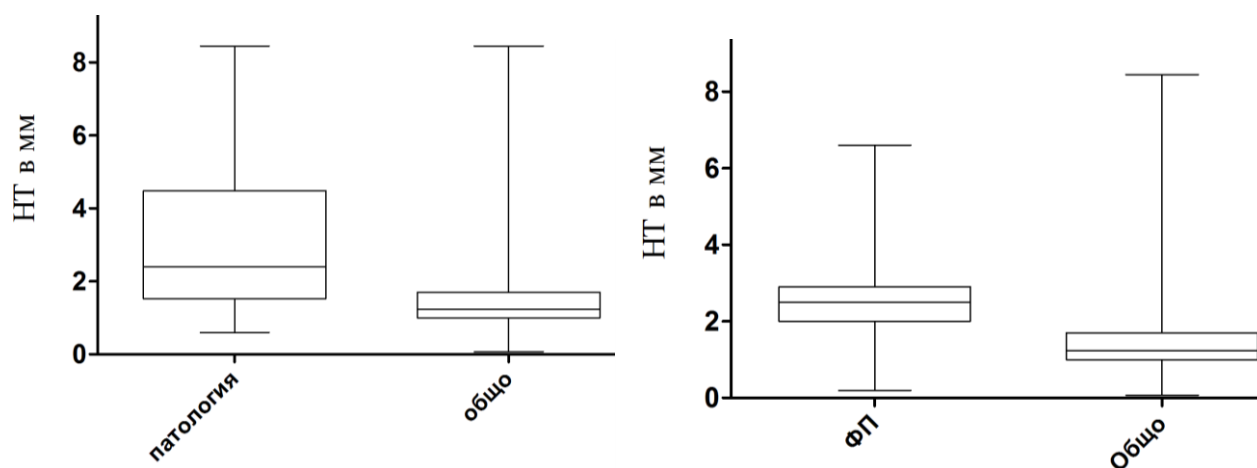
За провеждане на КБХС1 е необходим мултидисциплинарен подход и екипност. Увеличеният брой анализи през годините показва повишавана заангажираност на акушер-гинеколози и УЗ специалисти, активно въвели в своя инструментариум оценка на ехографски данни с количествено измерение CRL, НТ, НК маркери.

Изключително важно място при ранен скрининг, по същество изчисляващ комбиниран риск на база от биохимични и УЗ параметри, има точното замерване на редица ехографски маркери. Към периода на нашето изследване са въведени два главни УЗ маркера – НТ и носни кости.

Значимостта на точността на маркерите емпирично се потвърждава от многократно различната оценка на риска при невиждане на носни кости (отразени като отсъстващи) или грубо разминаване в замерване на НТ в милиметри, отчитана като нормална при стойност под 2.5 мм (Кременски И, 2014).

#### *Оценка на НТ*

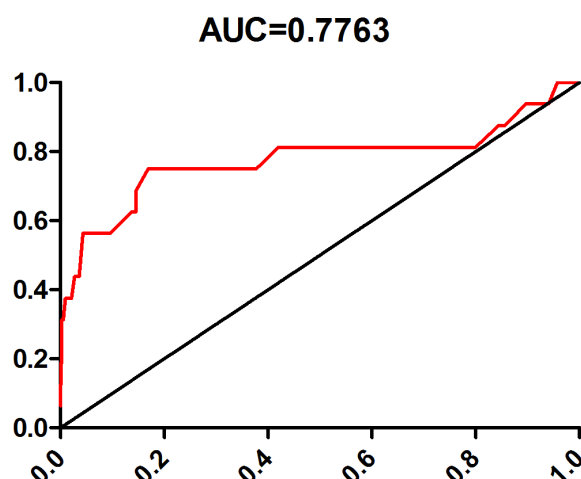
При разкрита патология средните стойности на НТ резултати (3.1 мм, SD 2.35) са значимо по-високи от тези при всички изследвани (1.34 мм, SD 0.57),  $p < 0.0001$  (Фиг. 8а). Наблюдава се значима статистическо различие на НТ при бременни с ФП (2.6 мм, SD 1.12) спрямо тези с нисък риск ( $p < 0.0001$ ), което показва, че неправилното замерване на НТ е от ключово значение в оценката на риска и изкуствено завишава ФП резултати (Фиг. 7б).



Фигура 7. а) Средна стойност на НТ при жени с патология спрямо тази при всички изследвани; б) средна стойност на НТ на жени с ФП резултати спрямо тази при всички изследвани

От верифицираните общо 32 диагнози (15 от КНХС1 + 17 от ИР) в 12 случая, т.е. 37.5% са налични данни за повишена НТ > 1.95МоМ (очаквани 70%). За период от само две години Петрова, 2012 съобщават патологично НТ в два пъти по-нисък процент 12.5% по данни от национален консорциум. При УЗ в 11-14 г.с. Марков, 2004 разкрива в 4.6% структурни аномалии в плода, като в 5.7% те се асоциират с хромозомна болест. Този факт още веднъж показва значението на адекватния УЗ подход, че точното измерване и коректно отбелязване на всички УЗ показатели е от изключителна важност за изчисляване на риска.

При сравнение на НТ при бременности с патология Т21, Т18, Т13 и групата на всички изследвани с КБХС1, в една и съща гестационна седмица се наблюдава значима статистическа разлика, като НТ е по-информативен в 11 г.с. спрямо 12 г.с. Тези данни са в противоречие с препоръката на ISPD, отчитаща по-развитата анатомия на плода в по-напреднала бременност и логично по-високата информативност, но съответстват на данните от проучването FASTER (Wenstrom K, 2005). Коефициентът AUC за информативността на НТ е равен на 0.7763 (Фиг. 8).



*Фигура 8. Рос крива, представяща информативността на НТ маркера*

### **Оценка на носни кости**

От 11 случая с Т21 само в **1 (9.1%)** УЗ прегледът отбелязва липсващи носни кости. От останалите 10 в 5 случая са отбелязани като налични, а в 5 не са измерени / няма данни. От литературните данни, според които в 70-75% от фетусите със синдром на Даун те отсъстват, следва, че от общо 11 случая с Т21 в приблизително 8 се очаква този маркер да бъде показателен (да липсва). Данните съответстват на представените 10% при обобщение на резултати на национално ниво за период 01.2009-03.2011 (Петрова Я, 2012).

Резултатът може да бъде коментиран като липса на достатъчен опит за оценка на този ехографски маркер. Въпреки че не може да се определи точният брой, насочвани са бременни за извършване на КБХС1 без оценка на НК (в таблицата означени с „няма данни“). В процеса на развитие на дейността по КБХС1 първоначално задължителното изискване за замерване на наличието / отсъствието на НК се запазва, но в оценката на риска при софтуерното изчисляване участва само отсъствието на НК. НГЛ извършва крайното изчисление на риска с маркера НК само при категорично описание на липсващи такива в унисон с препоръките на ISPD. Коректното оценяване на този маркер би повишило чувствителността и намалило ФП резултати.

Опциите в програмата са три - налични, липсващи или не е отбелязано. Това поставя въпроса как следва да се отбелязват хипопластични носни кости, доказан белег за Т21. В случай **№16**, представен в раздел резултати с ИР, при първоначално проведен КБХС1 с данни за налични НК и НТ = 3 мм, е изчислен риск 1/75 за Т21. МГК предлага диагностична процедура, следвайки утвърдения алгоритъм, с алтернатива за повторен УЗ преглед. По желание на

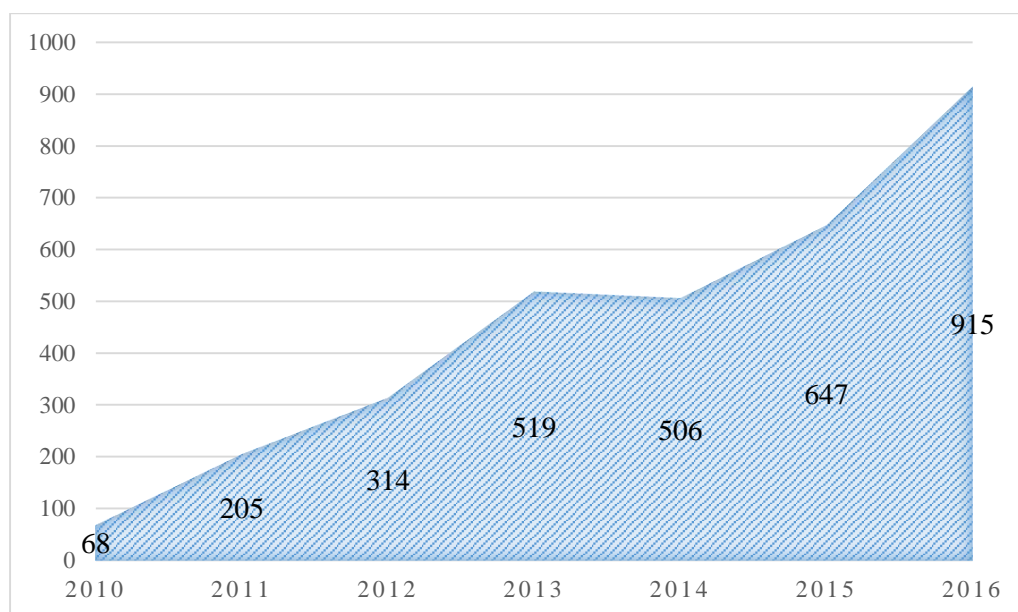
бременната е проведен и втори КБХС1, при който е изчислен риск 1/980 поради НТ=2.7 мм и вписани налични НК въпреки отбелязаната им хипоплазия. Последващото изчисляване на ИР с данните от повторения КБХС1 не извеждат показания за АЦ. Ражда се дете с Т21. Този случай повдига редица въпроси извън утвърдените алгоритми на работа при БХС. Трудно е да се даде еднозначен отговор на това кой подход е най-подходящ, но в случая генетичният скрининг се оказва неефективен.

Необходима е колаборация със сертифицирани за целта лекари за УЗ преглед по „фетална анатомия“. Въпросът за ехографската специализация за коректно провеждане на фетална морфология не е обект на тази работа, но всички ехографски маркери се коментират в светлината на точността на крайния резултат (Д. Марков, 2004). Дали нормалната ехография има по-голяма тежест от БХС? Ултразвуковите и биохимичните маркери са допълващи се и не може да се конкурират или доминират (Кременски И, 2005).

### 1.3. Резултати и обсъждане на скрининг с изчисляване на интегриран риск

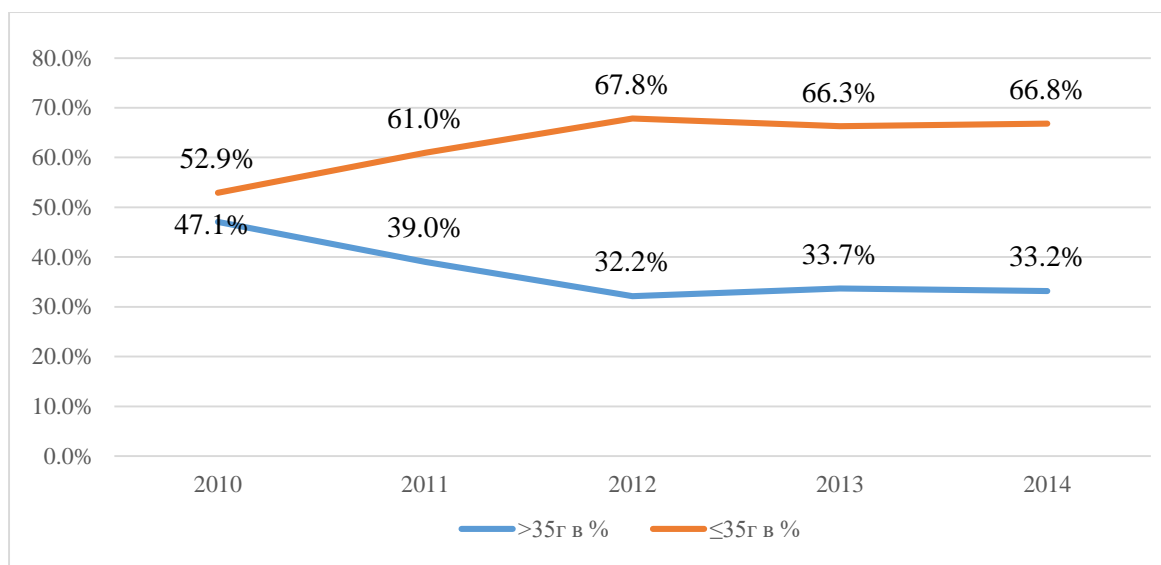
#### 1.3.1. Характеристика на групата жени, изследвани с изчислен ИР

Общият брой жени, провели и КБХС1 и БХС2 с **изчислен ИР** в ЛМГВ за периода 2010-2014 г., е **1 612**. Наблюдава се ежегодното нарастване броя на проведените скрининги с оценка на ИР, като тази положителна тенденция се запазва през следващите две години (Фиг. 9).



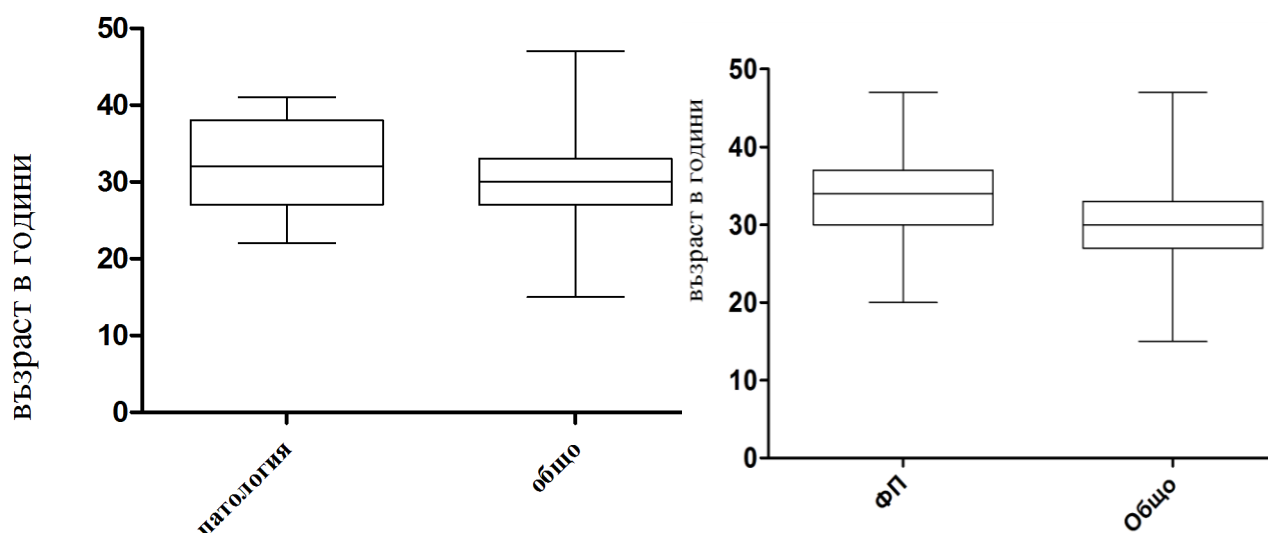
Фигура 9. Брой жени, провели скрининг с оценка на ИР за период 2010-2016 г.

Преобладаващият дял по възраст в категорията за изчисляване на ИР са жените под 35 години (65.5%, аналогично на БХС2 и КБХС1), като съотношението им спрямо тези с повишена възраст (34.5%) се запазва през годините (Фиг. 10).



Фигура 10. Разпределение по години на жени над и под 35 г., провели скрининг с изчисляване на ИР

Средната възраст на тези 1 612 жени е **32.8 г.** (SD 4.8). Наблюдава се сравнително постоянство в средната възрастта, като при жени с фетус с потвърдена хромозомна болест средната възраст е по-висока – **33 г.** (SD 6.15),  $p=0.065$  - много близо до сигнификантната стойност. Средната възраст при жени с ФП резултати е сигнификантно по-висока от средната възраст при всички изследвани ( $p < 0.0001$ ) (Фиг. 11). Обяснението на този факт се намира във включването на възрастовия фактор в общата оценка на риска. Резултатите са аналогични на тези от БХС2 и КБХС1.

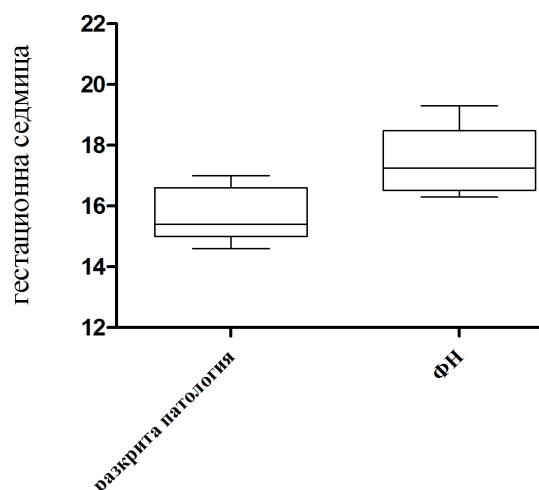


Фигура 11. а) Средна възраст (СВ) на жени с патология спрямо СВ на всички изследвани; б) СВ на жени с ФП резултати спрямо СВ на всички изследвани

Таблица 11. Средна възраст на майката и средна гестационна възраст на плода при провеждане на изследването с данни за стандартно отклонение (SD) при описаните категории бременности

Категория	Общо	Общо доказана хромозомна патология	ФП	ФН	„Уловена“ патология
Брой	1 612	17	109	8	9
Средна възраст	32.9	30.9	33.9	32.8	28.7
SD	4.83	5.37	5.11	4.52	6.08
Средна ГВ	16.6	16.7	16.1	17.5	15.7
SD	1.48	1.34	0.97	1.11	0.91

По отношение на представянето на ИР в зависимост от срока на провеждането му се разкрива **статистически значима разлика между средните стойности на ГВ за групата жени с разкрита патология и тези с изчислен ФН резултат ( $p=0.0193$ )** (Фиг. 12).



Фигура 12. Средните стойности на ГВ за групата жени с разкрита патология спрямо тези с изчислен ФН резултат

Чувствителността (разкриваемостта) на ИР е по-добро в по-ранния период, може би произтичащо от данните от БХС2 за по-висока чувствителност в 15 г.с. По-ранният срок освен това е предпочитан поради ранната информираност на бременната.

### 1.3.2. Разпределение на изследваната група по рискови категории

Оценката на интегриран риск са получили общо **1 612** бременни. В началото е възприет подходът на **„контингентен“ скрининг**, според който на 945 жени (58.6%) с *междинен* риск от ранен тест е препоръчан късен тест с ИР. Към тази група се включват и още 407 (25.2%) бременни с **висок** риск, въздържали се от ранна инвазивна манипулация (ХБ), недостъпна в региона. Въпреки препоръката за диагностична процедура от генетичната консултация жените и/или наблюдаващия бременността акушер-гинеколог са пожелали и допълнителен БХС2 с изчисляване на ИР. Останалите 260 (16.1%) жени провеждат ИР без показание, което не допринася за повишаване разкриваемостта скрининговата програма.

В процеса на утвърждаване на скрининговия подход, изчисляване на интегриран риск започва да се предлага на всички бременни, провели и двата теста и пожелали интегрирана оценка, независимо от риска от ранния тест. Така постепенно се преминава към подход на **„последователен“ скрининг** с изследване и на 260 жени (16.1%) с *нисък* риск. Фактор за това се оказват както нарастващата информираност на жените за по-висока чувствителност при изследване с ИР, така и изцяло поетото финансиране на скрининговата дейност от МЗ от 2015 година.



От общо 1 612 бременни 117 (7.3%) са показали повишен риск (7.3% от 2 814 за 2016 г. съобщава А. Савов), като преобладават жените в по-млада възраст под 35 г. - 66 (56.4%) (Таблица 12).

*Таблица 12. Разпределение на жените, провели биохимичен скрининг с изчисляване на ИР по рискови категории и възраст*

Категория рискове	Жени ≤ 35 г. брой		Жени > 35 г. брой		Общо	
<b>Висок риск –</b> стойност ≤1/250	66	56.4%	51	43.6%	117	7.3%
<b>Нисък риск</b>	990	66.2%	505	33.8%	1 495	92.7%
<b>Общо</b>	1056	65.5	556	34.5%	1 612	100%

### 1.3.3. Принос на оценката на ИР за разкриване на хромозомни анеуплоидии

Документалният метод ни дава възможност за верифициране на 17 пре- и постнатално диагностицирани случаи с хромозомна болест сред 1 612 жени (1.1%), провели биохимичен скрининг с оценка на ИР. Информация със стойностите на маркерите в плода и изхода от бременността са представени в Таблица 13.

*Таблица 13. Случаи с пре- и постнатално верифицирана диагноза след проведен биохимичен скрининг с изчисляване на ИР*

№	В ъ з р а с т	КБХ С1	Био хим иче н рис к	РАР Р- Мо М	free βhCG МоМ	НТ МоМ	Н К	БХС2	AFP МоМ	free βhCG МоМ	ИР	Изход от бремен- ността
1	26	1 от 1300	1 от 450	0.65	2.4	1.44	Да	1 от 15	0.44	4.22	1 от 10	Аборт на фетус Т21
2	29	1 от 430	1 от 1100	0.46	0.9	2.04	Да	1 от 880	0.71	1.46	1от 20	Аборт на фетус Т21
3	23	1 от 65	1 от 160	0.14	1.13	1.72	Да	1 от 640	0.84	2.58	1 от 20	Аборт на фетус Т21
4	39	1 от 1300; 1 от 130 за Т18	1 от 200	0.19	0.08	0.47	Да	1 от 1500 за Т21; 1от 240 за	0.78	0.13	1 от 2800 за Т21 1 от 95 за Т18	Аборт на фетус Т18

								T18				
5	25	1 от 290	1 от 550	0.57	2.11	1.66	Да	1 от 180	2.69	4.29	1 от 25	Аборт на фетус МОНОЗОМИЯ X
6	37	1 от 1500	1 от 80	0.72	2.75	0.8	Да	1 от 15	0.48	2.77	1 от 270	Аборт на фетус двойна транслокация
7	27	1 от 790	1 от 2900	0.46	0.55	1.82	Да	1 от 3700	0.78	0.73	1 от 520	Аборт на фетус с 45,X[25]/46, XXp+[8]/46, XX[11]
8	24	1 от 270	1 от 15	0.2	5.5	0.86	Да	1 от 45	0.71	4.55	1 от 55	Родено дете с T21
9	35	1 от 80	1 от 220				Да	1 от 1900			1 от 35	Родено дете с T21
10	34	1 от 75 /1 от 980	1 от 2400 / 1 от 2700	0.85	0.71	2.16	Хи по пл ази я	1 от 2000	0.99	0.9	1 от 65/1 от 620	Родено дете с T21, t (21,21)
11	38	1 от 2600	1 от 500	1.24	1.7	1.05	ня ма дан ни	1 от 45	0.49	1.78	1 от 470	аборт на фетус с T21
12	35	1 от 820		0.24	0.83	1.27		1 от 1900	1.13	1.08	1от 1300	фалшиво (-), родено дете с T21
13	28	1 от 1000	1 от 4400	1.01	0.89	1.86	Да	1 от 6700	0.93	0.72	1 от 2000	фалшиво (-), родено дете с T21
14	29	1 от 610	1 от 110	0.37	2.95	0.82	ня ма дан ни	1 от 120	0.52	2.38	1 от 260	фалшиво (-), роденодете с T21
15	36	1 от 4000	1 от 330	0.65	1.28	1	Да	1 от 650	0.81	1.07	1 от 5700	фалшиво (-), родено дете с mos T21
16	37	1 от 5800	1 от 710	0.36	0.05	0.75	Да	1 от 430	0.88	0.13	1 от 790 за T18	фалшиво (-) родено дете с T18
17	27	1 от 2100 за T18	1 от 1800	0.09	0.1		Да	1 от 2500	0.87	0.08	1 от 1800	фалшиво (-) родено дете с T18

Разкрити с хромозомна патология са **9** от 17 (52.9%) случая с ИР по-висок от 1/250 (Таблица 20): 6 случая с тризомия 21 (**№1, 2, 3, 8, 9 и 10**); в 1 случай с тризомия 18 (**№4**); в 1 случай с монозомия X (**№5**). При всички случаи, с изключение на два, е проведена АЦ и патологията е потвърдена пренатално. В случай **№8 и 9** въпреки повишените рискове пренатална диагностична процедура не е проведена и диагноза Т21 е потвърдена след раждането. Допълнително 2 случая без повишен ИР са с пренатално разкрита патология: 1 двойна балансирана транслокация (**№6**) 46,XY,t(3;4)(p12;q13), t(8;10)(q22;p12)[15], 1 с Т21 с повишен БХС2 (**№11**). При случай **№6** на бременност след in vitro процедура с граничен риск (1 от 270 - cut off 1 от 250) се отчита допълнителна „неспецифична“ заслуга на теста. Касае се за цитогенетичен анализ, разкриващ de novo двойна транслокация в плода, а последващ молекулярногенетичен анализ - данни за небалансирано преустройство без ясна фенотипна изява. Намерената патология насочва към засиления контрол на бременности от асистирана репродукция и поставя проблема с генетичната консултация при патология с неясна фенотипна изява. Ясно е обаче, че границата 1 от 250 е условна. **Приемането на по-нисък (граничен или междинен) риск би повишило откриваемостта, но би повишило и тревожността на жените от фалшиво положителен резултат. Следователно бременната сама определя каква величина на риска е допустима за нея.**

В случай **№10** високите рискове от първоначално проведения скрининг не са взети под внимание поради повторение с нови УЗ данни и „успокоение“ на бременната, след което се ражда дете с Т21. Това желание от страна на бременната за повторение на изследването при различни специалисти с различни ехографски данни не са единични в практиката и повдигат въпроса за това кои УЗ параметри трябва да бъдат приемани за включване в оценката на риска – първоначалните, „тревожещи“ или повторените често пъти успокояващо нормални параметри. Нямаме данни за точния брой на повторени резултати, тъй като редица външни за консорциума лаборатории предлагат БХС.

По препоръка на НГЛ при провеждане на МГК на висок риск с НТ над 2.5 мм се препоръчва контролна ехография. Дали и доколко е приемливо повторението на резултати? На кой ехографски преглед трябва да се доверим и да се повтори ли оценката на риска с новите параметри? „Нормалната“ ехография не може да има по-голяма тежест от БХС – това са два взаимодопълващи се метода с една цел. Няма еднозначен отговор на тези въпроси и за

да оценим статистически тези казуси, е необходимо натрупване на по-голяма база данни. Именно в такива ситуации добрата МГК спомага за постигане на удовлетвореност от избора на подход, подпомагайки вземането на оптимално решение от бременната / семейството. Целта е да се представят всички предимства и недостатъци на възможните подходи, с което се цели максимална информираност.

Фалшиво отрицателен интегриран риск е получен в 6 случая: 4 за тризомия 21, (**№12, 13, 14 и 15**) и 2 за тризомия 18 (**№16 и 17**). В три от четирите ФО резултати за T21 се касае за категорично изпускане на патологията от скрининга по всички видове изчисления. Само в случай **№14** изчисленият ИР е **граничен** 1/260, което заедно със самостоятелно повишения риск от биохимичните маркери 1/120 може да се разчете като сигнал за последващ анализ. За съжаление това не е направено, за разлика от коментара по-горе за субективността на cut off (случай **№6**). Въпреки това БХС2 в този, както и случаи **№6 и 11** показват завишен риск от БХС2, но с граничен ИР. В единия случай бременната преценява тази разнопосочност на резултатите като незадоволителна и предприема диагностична процедура.

В други 379 от 1495 (25.4%) с нисък ИР рискът от БХС2 самостоятелно е висок. **Т.е. 2 от 381 (0.5%) оценката от ИР не би трябвало да се интерпретира независимо от риска при БХС2.** До колко това следва да бъде модел на поведение в генетичната профилактика, е трудно да се твърди категорично поради малкия брой изследвания с изчисляване на ИР и други финансови и технически съображения.

В двата случая с T18 извън общата оценка на риска има отклонение в хормоналния профил. В този смисъл въпреки липсата на индикация за диагностична процедура (+ от УЗ преглед) следва да се коментират ниските стойности на биохимичните маркери (free  $\beta$ hCG 0.13 и 0.08).

В три от 6 ФО случая възрастта е гранична или над > 35 г. (35, 36 и 37 г.) и би могло да бъде самостоятелна индикация за диагностична процедура, но в други 51 жени с повишен ИР и над 35 г. би била ненужна манипулация с риск за плода и бременната.

Случай **№7** на хромозомно преустройство, включващо X, мозаечен вариант 45,X[25]/46,XXp+[8]/46,X[11] отново поставя въпроса за неспецифичността на БХС и важността на МГК при случайни находки.

Таблица 14. Количествени показатели за ефективност на ИР при cut off 1/100, 1/250, 1/350; РП - реално позитивни, ФП - фалшиво позитивни, ФО - фалшиво отрицателни

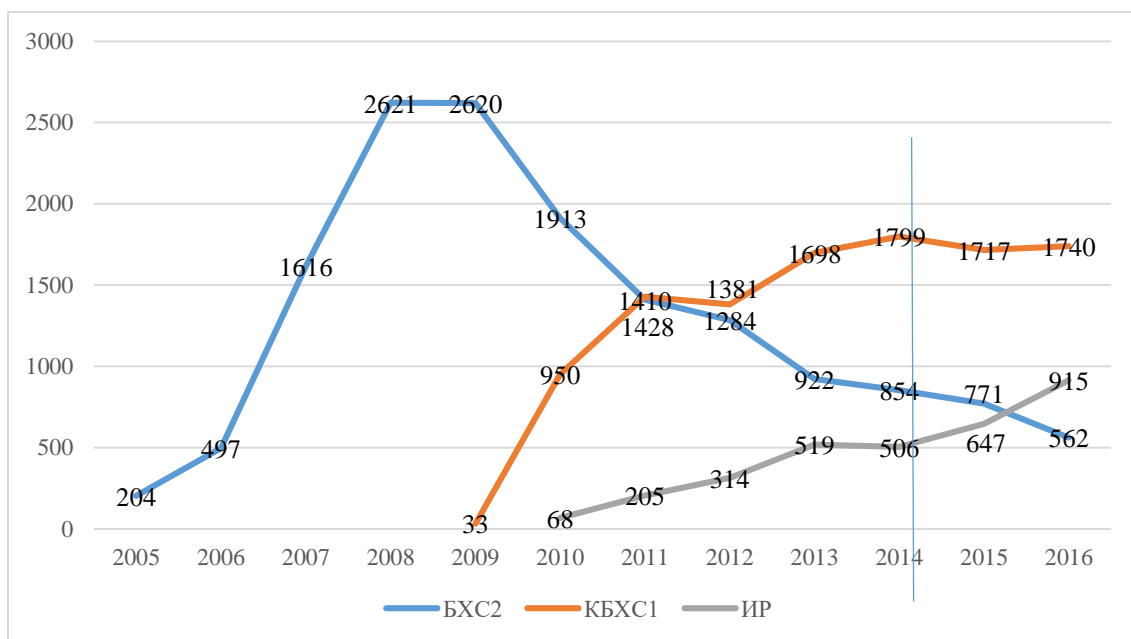
Категория приет cut off при ИР	Чувствителност = РП/РП+ФО	Специфичност = РО/РО+ФО	позитивна предиктивна стойност = РП/РП+ФП	ФП %	ФО %
cut off 1/100	47.1%	93.2%	6.8%	6.6%	52.9%
cut off 1/250	53%	93.3%	7.7%	6.7%	47%
cut off 1/350	58.8%	93.3%	8.5%	6.8%	41.2%

Противно на очакванията за най-добро представяне ИР има ниска чувствителност - 53%, като тя би била 64.7%, ако включим допълнителните два случая заслуга на медико-генетичното консултиране. Въпреки това ФП са значителен процент. При избор на по-висок cut off 1/350 чувствителността се повишава, но далеч под очакваната при висок процент ФП резултати (Таблица 14).

#### 1.4. Сравнителни данни на ефекта от трите различни оценки на риск

За период от 10 години, от месец март 2005 г. до месец декември 2014 г., са проведени изследвания (КБХС1, БХС2 и ИР) на **22 839** бременни жени, преминали през Лаборатория по медицинска генетика при УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД - Варна. Разпределението по години показва нарастване на търсенето на късния тест до 2009 г., когато започва да намалява за сметка на ранния и по-високо чувствителен скрининг тест (КБХС1) след въвеждането му в ЛМГВ. От 2010 година и до момента се задържа трайна тенденция за нарастване на КБХС1 (което се наблюдава и извън обхвата на проучването - 2015, 2016 г.), като след 2011 общо броят достига 3000 жени годишно. Това е в унисон с изискванията за необходимия минимум за самостоятелно действаща сателитна база към общ сървър по европейските стандарти за качество и надеждност на резултатите. По стандарт на Британската агенция за пренатална скринингова програма при наличието на една централна лаборатория, извършваща минимум 10 000 изследвания годишно (НГЛ София), се допуска свързването към нея на минимум 3 сателитни лаборатории, които могат да извършват между 3000 и 5000 изследвания годишно. (<https://www.gov.uk/topic/population-screening-programmes/fetal-anomaly>).

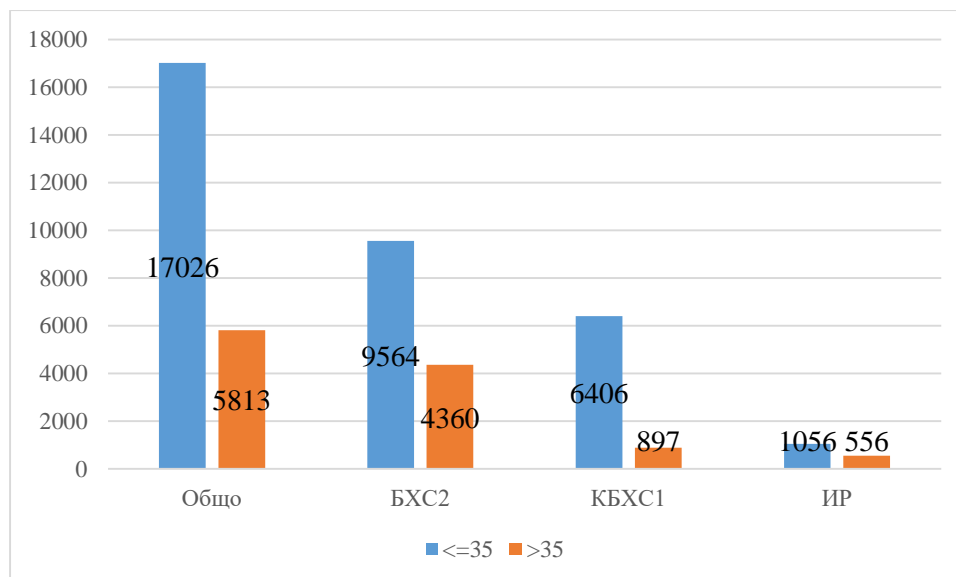
Трите групи са различни по размер поради различния период на стартиране на анализите, въз основа на което не са сравнявани по брой, а се коментира тенденция (Фиг. 13). На фона на данните за ниска чувствителност при провеждане самостоятелно БХС2 процентът му към 2014 (27%) все още е значително висок. За 2016 г. провели само БХС2 в лаборатории от консорциума са 26.2% от всички изследвани (Савов А, 2017).



Фигура 13. Общ брой изследвания по вид и година

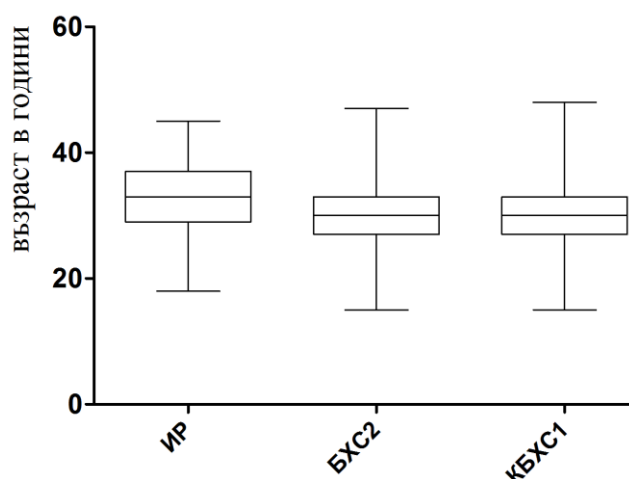
Данните за разпределение на жените по възраст и в трите вида скрининг показват доминиране на жените под 35 години (87% при КБХС1, 68.7% при БХС2, 65.5% при ИР), като тази тенденция се запазва в годините. Това показва постигане на целта за популяризиране на скрининговата програма сред по-високия процент жени в репродуктивна възраст (под 35 г.), на които всъщност се дължи по-висок процент от хромозомната патология.

Разпределение на всички бременни, преминали скрининг, са представени на фигура 15. През 2010 г. процентът жени над 35 г. се покачва, което може да се обясни с предоставената от ИР възможност за постигане на по-висока чувствителност на теста, предпочитана от жени със завишен възрастов риск (Фиг. 14).



Фигура 14. Брой бременни по възраст, провели БХС за период 2005-2014 г.

От общо 22 839 изследвани бременни, 17 033 (**74.6%**) са на възраст под 35 години и 5 806 (**25.4%**) над 35 години; средна възраст **30.5 г.** Средната възраст при КБХС1 - **29.9 (SD 4.6)**, БХС2 - **30.1 (SD 4.8)**, ИР - **32.8 (SD 4.8)**, разкрива зависимост жени в по-напреднала възраст да изберат и двата анализа с изчисляване на ИР ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 15). Това е очаквано, имайки предвид данните за по-висок процент изчислени високи рискове сред жени над 35 г.



Фигура 15. Сравнителен анализ по възраст между отделните видове БХС

По отношение чувствителността на отделните генетични скринингови изследвания анализът на данните за изследвания период на цялата патология, показва предимство за КБХС1 със значимо по-нисък процент

на ФП резултати от 1.5% за КБХС1 спрямо 8.6% за БХС2 и 6.7% за ИР (Таблица 15). Като най-показателен маркер се счита ППС, който има най-добри стойности при ИР и КБХС1 - 7.7%, спрямо значително по-лошо представилия се БХС2 - 0.8%.

Заедно с най-висока специфичност и чувствителност, съответно 98.5% и 60%, самостоятелно предлаганият КБХС1 се явява най-добрият подход за скрининг за анеуплоидии при бременни жени при използвания от нас cut off от 1/250. Очаквано по-добри показатели с намаляване на ФП резултати биха се достигнали при cut off от 1/100, което е в съответствие с прилаганите програми в повечето европейски страни.

При прилагане на двата теста с интегрирана оценка на риска (ИР) се повишава броят на „уловените“ патологични бременности, но за сметка на висок процент ФП резултати - 6.7%.

Анализирайки показателите, по отношение само Т21, КБХС1 и ИР се представят на равно 54.5% при значително завишени ФП резултати 6.9% (при КБХС1 1.5%). Чувствителността остава под очакваната по литературни данни между 75-95%, при ФП 2-5% за ИР (Таблица 16). ППВ е почти равна при КБХС1 и ИР - 5.1% и 5%, вероятно поради по-малкия брой жени, провели ИР спрямо КБХС1 и равностойна откриваемост.



Категория	Брой	С повишен риск		„Уловена“ хромозомна патология (чувствителност)		Фалшиво (+)		Общо доказана хромозомна патология		Фалшиво (-)		ППС		Специфичност
		бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	
Ранен скрининг	7 303	117	1.6%	9	60%	108	1.5%	15		6	40%			98.5%
Късен скрининг	13 924	1 210	8.7%	10	47.6%	1 200	8.6%	21		11	52.4%			91.4%
Последователен подход	1 612	117	7.3%	9	53%	108	6.7%	17		8	47%			93.3%
с интегриран риск				(11)	(64.7%)	(106)	(6.6%)			(6)	(35.3%)			(93.4%)
				(13)	(61.9%)	(1 197)	(8.6%)			(8)	(38.1%)			(91.4%)

Таблица 15. Данните представят информация по отношение диагностиката на цялата патология; в скоби са изчислени параметрите с принос на МГК

Категория	Брой	С повишен риск		„Уловена“ патология с T21 (чувствителност)		Фалшиво (+)		Общо доказани случаи с T21		Фалшиво (-) T21		ППС	Специфичност
		бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	%	%
Ранен скрининг	7303	117	1.6%	6	54.5%	111	1.5%	11	5	45.5%	5.1%	98.5%	
Късен скрининг	13924	1210	8.7%	9	52.9%	1201	8.6%	17	8	47.1%	0.7%	91.4%	
Последователен				(10)	(58.8%)	(1200)	(8.6%)		(7)	(41.2%)	(0.8%)	(91.4%)	
интегриран риск	1612	117	7.3%	6	54.5%	111	6.9%	11	5	45.5%	5%	93.1%	
				(7)	(63.6%)	(110)	(6.8%)		(4)	(36.4%)	(6%)	(93.2%)	

Таблица 16. Данните представят информация по отношение диагностиката **само на T21**; в скоби са изчислени параметрите с принос на МГК

От всички жени, провели генетичен скрининг, независимо от техния риск, сумарно разполагаме с данни за **53** диагностицирани случая на хромозомна патология. В **48** се касае за анеуплоидии (Таблица 17). **Въпреки че повишените рискове доминират в групата на жени над 35 г. (74.6%), в по-големия процент от случаите – 28 (58.3%), се касае за бременни до 35 г.** Тази статистика се потвърждава и от литературните данни.

*Таблица 17. Брой случаи с хромозомна патология, разпределени по вид и възраст на майката*

	<= 35 години				> 35 години				T21+T18+13
	КБХС1	БХС2	ИР	общо	КБХС1	БХС2	ИР	общо	
<b>T21</b>	3	11	9	<b>23</b>	8	6	2	<b>16</b>	<b>39</b>
<b>T18</b>	1	1	1	<b>3</b>	1	1	2	<b>4</b>	<b>7</b>
<b>T13</b>	2	0	0	<b>2</b>	0	0	0	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>общо</b>	6	12	10	<b>28</b>	9	7	4	<b>20</b>	<b>48</b>

За изследвания период на база 22 839 бременности в ЛМГВ, пре- и постнатално са разкрити общо **53** случая с хромозомна болест. За този период 2005-2014 в ЛМГВ са диагностицирани постнатално общо **175** случая на хромозомна болест (T21, T18, T13, монозомия X). От тях с T21 са **127** случая (72.6%), T18 - **9** (5.1%), T13 - **1** (0.6%), **38** (21.7%) с монозомия X. **От диагностицираните с хромозомна болест без проведен скрининг по време на бременността са съответно 113 за T21, 6 за T18, 0 за T13, 38 монозомия X (вкл. цитогенетични варианти).** Касае се за пациенти в широк възрастов диапазон с фенотипни белези на хромозомна болест, насочвани от различни региони, което обяснява големия брой патология, диагностицирана постнатално без проведен БХС. Въпреки това, през изследвания период, 112 са новородените с хромозомна болест с T21, T18, T13 (**средно по 11 случая годишно**) - резултат от реализирани бременности без квалифицирана форма на пренатална генетична профилактика.

**Големият брой случаи с монозомия X контрастира с липсата на разкрити случаи чрез КБХС1.** След диагностична процедура с показание от генетичен скрининг с изчисляване на ИР са уловени два случая с монозомия X (един вариант на монозомия X мозайка), но при междинни стойности на риска от КБХС1. Дали находката е случайна, имайки предвид очаквано високата честота на състоянието в популацията, или е в резултат на чувствителност на метода, е трудно да се заключи категорично. **Като цяло майчиният**

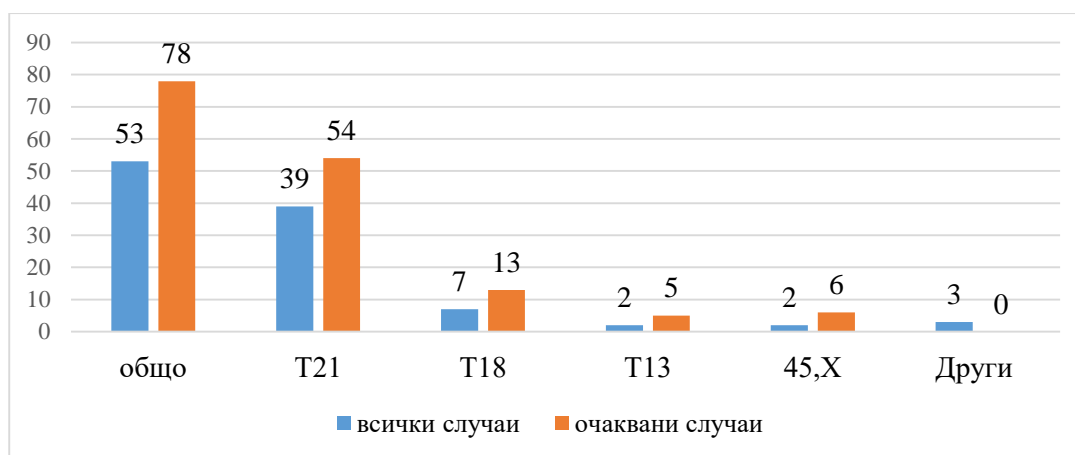
**биохимичен скрининг като метод на пренатална профилактика акцентира върху разкриването на T21.**

Обобщено, броят на разкритите случаи проследени с проведена пренатална диагностика спрямо общия брой с разкрита патология сред жени провели скрининг е: за Тризомия 21 - 14 (35.9%) от 39 случая, за Тризомия 18 - 3 (42.9%) от 7, Тризомия 13 - 1 (50%) от 2, монозомия X - 1(50%) от 2, 3 разкрити случая с друго хромозомно нарушение. Тези цифри биха могли да се коментират като реален резултат от ефективността на БХС, тъй като субективният ни опит показва желание от бременната за пренатално диагностицирана патология. По-ниски от желаните проценти се дължат както на ФН резултати, така и на други причини (финансови, организационни, етични и др.)

**Данните от постнаталния цитогенетичен регистър показват флуктуация в броя на родените за периода на провеждане на пренаталния скрининг (2005-2016), без да може да се оформи ясна, което вероятно се влияе и от различия в броя раждания през визирания период.**

На Фигура 16 е представен очакваният брой патология за T21, T18, T13, монозомия X, при честота на заболяванията, приблизителна на средната съобщена по литературни данни (честота по данни на EUROCAT, в която се включват данни за живородени, мъртвородени, аборт по медицински показания). **Общо разкритата патология при жени, провели БХС (53 случая), е 70.7% от очакваната за изследваната група.** Това би могло да се дължи на невъзможност за проследяване на всички бременности, аборт на бременности с патология на по-късен етап при жени с нисък риск, спонтанен аборт в по-ранен етап на бременността и/или по-ниска честота на заболяванията у нас.

Единствено по отношение на T21 БХС разкрива значителен процент (72.2%) от очакваната патология. Имаме данни и за единичен (11.1%) случай на *специфично* повишен риск с потвърдена T18. **Подкрепя се широко възприетата нагласа за БХС като метод за пренатална генетична профилактика за синдрома на Даун.** Останалата разкрита патология е по-скоро допълнителен принос.



Фигура 16. **Всички** случаи - представляват сумарната бройка от разкритата от БХС патология + случаи с ФО резултати; **очаквани** случаи - пресметната по честота на EUROCAT за изследвания брой бременности

Въпреки активната дейност на генетичната консултация нямаме информация за изхода от бременностите на всички жени с повишен риск от скрининг и/или възраст (дали са провели амниоцентеза, колко са случаите поети от звената в София и Пловдив). Липса на кадрови ресурс, време и трудности в комуникациите правят невъзможни проследяването и попълноценния анализ на резултатите и ефективността от дейността, при липса на централизирана уеб базирана система за пренатален скрининг и проследяване на бременностите. Това би дало възможност за максимално пълен анализ на пренаталната скринингова програма за анеуплоидии при плода.

## 2. Резултати и обсъждане на данни от инвазивна пренатална диагностика

В идеалния случай раждането на деца с хромозомни аномалии би могло да се предотврати чрез пренатална диагностика с цитогенетичен анализ при всички бременности. На практика обаче не е възможно по финансови причини и не е оправдано от медицинска и етична гледна точка да се предлага на всички бременни манипулация с по-висок риск за предизвикване на аборт (при амниоцентеза 0.1-1%), отколкото е възрастовият риск за хромозомна болест (от 1 на 1300 до 1 на 40). Поради тази причина амниоцентезата е селективен подход при бременни със статистически повишен риск над 0.5%, каквито са жените над 35 години. Дори и при това условие селективната пренатална

диагностика би решила проблема за 15-35% от хромозомните болести в зависимост от относителния дял на жените над тази възраст. В напредналите страни чрез такъв профилактичен подход се обхващат около 50-60% от нуждаещите се, в източноевропейските страни - около 15-20%, а в България – около 5%. Този процент е по-нисък в България поради относително ниския дял на бременните над тази възраст, но с устойчива тенденция към покачването му.

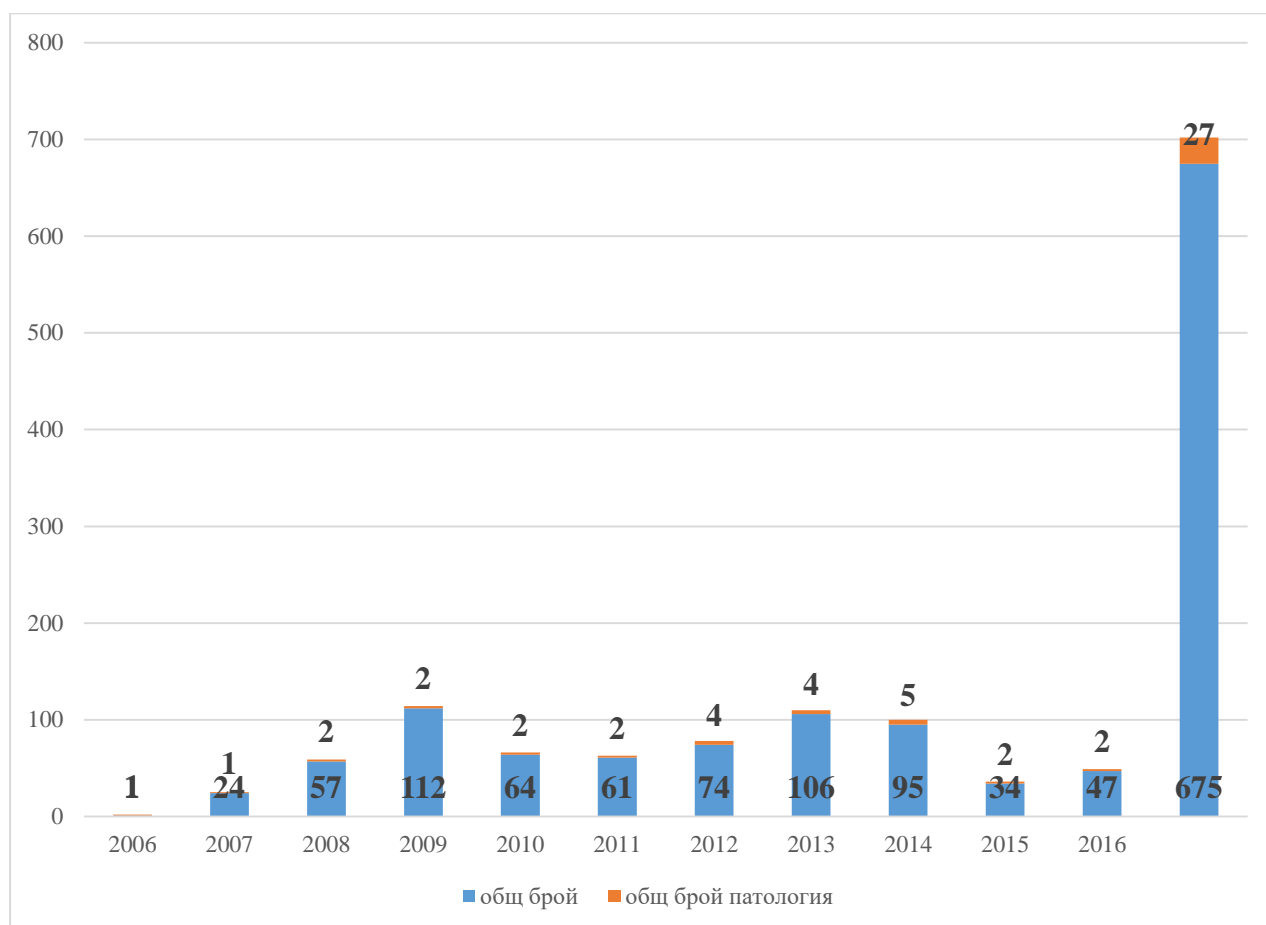
В новата ера на доминиращи неинвазивни генетични изследвания броят на инвазивни диагностични процедури намалява драстично и това оказва значително влияние върху клиничната практика. Въпреки наблюдаваната тенденция в последните години за изместване фокуса върху по-чувствителни скринингови тестове и намаляващия брой диагностични тестове все още масова е практиката за провеждане на БХС с последващ диагностичен метод при налични индикации.

Провеждането на амниоцентеза във Варна стартира почти две години след въвеждането на генетичния скрининг, т.е. в самия край на 2006 г., за да обслужва пациентите с повишен риск. Проведен е ретроспективен анализ, базиран на данни от архива на ЛМГ-Варна - т.е. само тези бременни, пожелали цитогенетично изследване самостоятелно или в комбинация с бърз ДНК тест, са включени в анализа. За периода от 10 години до 2016 включително амниоцентеза с провеждане на цитогенетичен анализ е проведена в ЛМГВ при **общо 675** жени. Амниотичната течност се подлага на цитогенетичен анализ в ЛМГ-Варна и ДНК анализ в ГМДЛ Геника - София, по показания - в Национална генетична лаборатория. Верификация на диагнозата е препоръчвана при медико-генетичното консултиране с два генетични метода, но поради финансови ограничения не при всички са проведени и двата анализа.

По отношение броя на проведените амниоцентези се наблюдава първоначален ръст, (аналогичен на ръста на броя проведени скринингови тестове и популяризиране на програмата сред жените), последван от тенденция на намаляване, особено в последните две години - 2015 и 2016 (фигура 17). На национално ниво се цитира същата тенденция със спад 31.5% (доклад А. Савов). Причините за това са:

- методични (преминаване към по-високочувствителния ранен скрининг с по-малко фалшиво положителни резултати);
- все по-масово предлагане на НЕГИ с почти диагностично висока чувствителност на теста, особено при жени с висок биохимичен или възрастов риск, или рискови бременности следасистирана репродукция;
- технически (високоспециализирана манипулация, изискваща опит и квалификация на извършващия персонал) с наличие на само един лекар за огромен регион от Североизточна България;

- субективни (предпочитания на местни акушер-гинеколози и/или бременна за провеждане на диагностична процедура в центрове в София).



Фигура 17. Брой АЦ и разкрита патология в ЛМГВ за период 2006-2016 г.

Средната възраст на жените, провели АЦ за изследвания период, е 34.5 г. (5.14 SD), по-висока от тази на масовия биохимичен скрининг, тъй като по-високи рискове са изчислени при по-възрастни, а и АЦ се провежда по индикация възраст самостоятелно. Броят на жените над 35 г. е 324 (48%), а тези под 35 г. – 351 (52%) (Таблица 18).

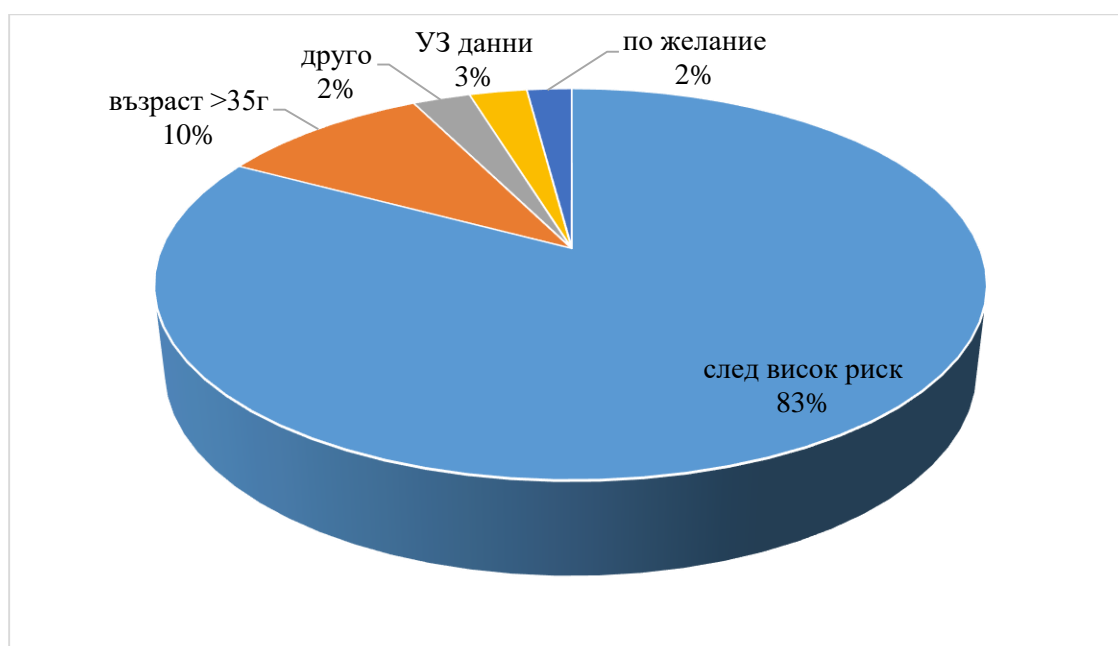
Таблица 18. Средна възраст на жени, провели АЦ, разпределени по категории

АЦ	Всички	> 35	≤ 35	патология
Брой изследвани	675	324	351	27
Средна възраст	34.5	38.8	30.6	34
SD	5.14	2.25	3.74	6.18

За постигане на икономическа и практическа ефективност на инвазивната манипулация амниоцентеза с диагностичен генетичен анализ, е необходимо прецизиране на индикациите за провеждането ѝ. За визирания период най-често показание е високият риск от БХС. По категории, резултатите са разпределени както следва (Фиг. 21):

- повишен риск от скрининг: общо **559** (82.8%) бременни
- възраст > 35 години към времето на анализ без скрининг или въпреки нормален резултат от него: **66** (9.8%) бременни
- УЗ маркери за хромозомна болест / комбинирани: **18** (2.7%)
- родено дете с хромозомна болест: **18** (2.7%)
- по желание (жени под 35 години): **14** (2.1%)

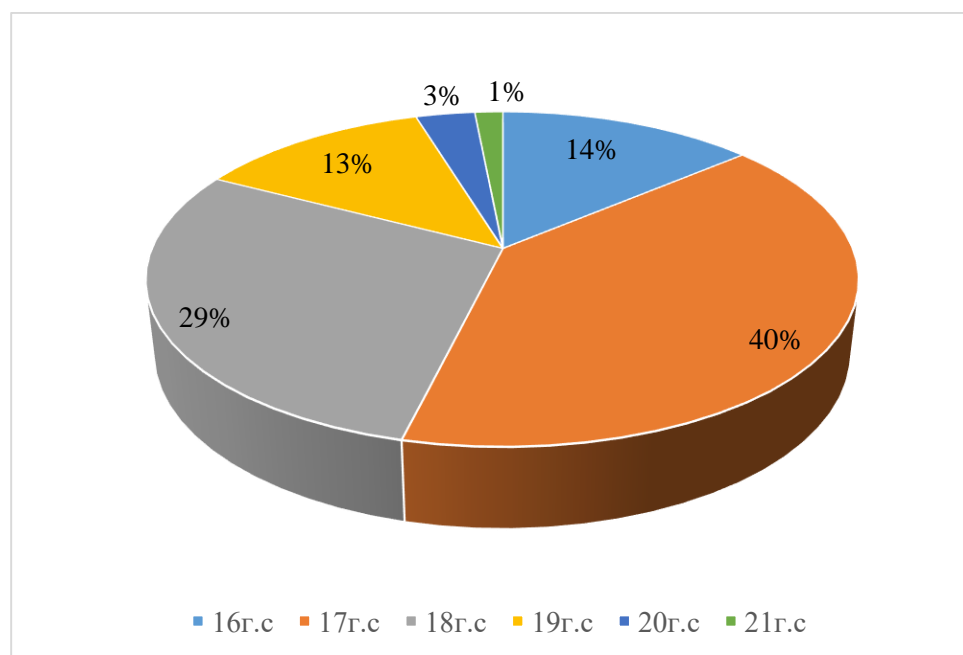
Ретроспективният анализ на контингента семейства, провели АЦ в ЛМГ-Варна, разкрива данни и за проведени АЦ по показание фамилно хромозомно преустройство при **7** (1%) и фамилно моногенно заболяване - **5** (0.7%), извън предмета на нашата цел. **Тези резултати обаче показват, че практически болшинството (98.3%) от проведената инвазивна манипулация е поради рискова бременност за анеуплоидия.**



*Фигура 18. Разпределение на жените, провели АЦ по показание; друго - включва предходна бременност или родено дете с хромозомна болест, други фамилни данни за вродена аномалия*



По-голям процент от жените, 83%, е провел амниоцентеза в 16, 17 и 18 седмица (Фиг. 19). Смята се, че по отношение на клетъчното култивиране през 17 г.с. растежът е оптимален. От друга страна е известно, че след 18 г.с. времето за разкриване на патология, за вземане на информирано решение при процедура, самата процедура, протичат по-тежко за жената. Останалите 17% от жените (в това число 4% в 20<sup>+</sup>г.с.) провеждат АЦ в относително по-късен етап. Стремешът към по-ранна диагностика следва да бъде приоритет, имайки предвид ползите за бременната, както от психологичен, така и технически аспект.



Фигура 19. Разпределение на жените, провели АЦ (2006-2016) според срока на бременността

В коя седмица диагнозата може да се приеме за „закъсняла“, е трудно да се коментира, тъй като това от една страна е въпрос на субективна оценка от страна на жената, от друга – редица фактори повлияват изпълнението на процедурата и последващия вид лабораторен анализ.

**Разкрита е хромозомна патология при 27 от общо 675 (4%) бременности.** От всички анализирани проби в един случай (0.2%) има неуспех с култивирането на амниоцити и невъзможност за издаване на резултат. В докладваната патология *не се включват* случаите с проведена амниоцентеза по показание за *моногенно* нарушение (таласемия, спинална мускулна атрофия и др., изследвани в НГЛ), както и тези с показание *фамилно хромозомно*

балансирано преустройство, без проведен биохимичен скрининг. Резултатите от разкритата патология са представени хронологично на Таблица 19.

Таблица 19. Принос на АЦ за разкриване на случаи с хромозомна патология

№	възраст	ГС	Показание	Резултат
1.	38	19+3	Висок риск от БХС	47,XX+21
2.	23	17+2	Висок риск от БХС	47,XY+21
3.	34	17+3	Висок риск от БХС	47,XX+21
4.	39	16+6	Висок риск от БХС	47,XX+21
5.	32	18+4	Висок риск от БХС	47,XX+21
6.	38	16+4	Висок риск от БХС	47,XY,+21
7.	34	17+2.	Висок риск от БХС	47,XX,+21
8.	34	19+4	Висок риск от БХС	47,XY,+21
9.	26	16+3	Висок риск от БХС	47,XX,+21
10.	29	16+	Висок риск от БХС	47,XY,+21
11.	35	17+3	Висок риск от БХС	47,XY,+21
12.	37	21+2	Висок риск от БХС	47,XY,+21
13.				
14.	40	17+2	ехографски данни за хромозомна болест	47,XY,+21
15.	37	18+3	Висок риск от БХС	47,XX,+21
16.	44	17+6	Висок риск от БХС	47,XX,+21
17.	22	18+3	Висок риск от БХС	46,XY,t(14;21)(q10;q10)+21
18.	37	17+1	Висок риск от БХС	47,XY+18
19.	39	20+4	Висок риск от БХС	47,XY+18
20.	39	18+4	Висок риск от БХС	47,XX,+18
21.	27	18+3	Висок риск от БХС	47,XX,+18
22.	45	20+1	ехографски данни за хромозомна болест	46,XY,der(10;13)+13
23.	25	18+0	Висок риск от БХС	46,XY[47]/46,XY,7q+[3]
24.	28	16+4	Висок риск от БХС	46,X,dupl.(X)(p22.2→p ter)
25.	35	16+5	Висок риск от БХС	mos 47, XX, + mar[13]/46, XX[12]
26.	37	16+5	Висок риск от БХС	46,XY,t(3;4)(p12;q13),t(8;10)(q22;p12)
27.	26	19+2	Висок риск от БХС	45,X[25]/46,XXp+[8]/46,XX[11]

### **При 22 (81.5%) бременни е разкрита фетална тризомия:**

- в 17 случая (63%) се касае за T21, в т.ч. 1 транслокационна форма,
- в 4 случая (14.8%) с T18,
- в 1 случай (3.7%) с T13, транслокационна форма.

**В останалите 5 случая (18.5%; №23, 24, 25, 26, 27) се касае за хромозомна патология, извън очакваната.** Това показва, че въпреки широко употребяваните методи за молекулярен анализ след проведена пренатална диагностична процедура с възможност за по-бърза диагностика цитогенетичният анализ има своето място. Въпреки това тези случаи създават трудности в генетичната консултация по отношение на тяхната клинична значимост. При de novo находка заключението не би могло да бъде категорично както при небалансиран, така и при условно балансиран кариотип. Диагностичният процес изисква прецизиране чрез по-високорезолютивен генетичен анализ с допълнително време и тревожност в семейството.

Неясните ситуации отчасти се дължат на недостатъците на метода, свързани с:

- Анализът с новите молекулярни методи може да разкрие информация, за която няма категорични данни за генотипна-фенотипна корелация.
- Възникване на технически лабораторни затруднения и невъзможност за анализ на феталния материал (с вероятност < 1%).
- Резултатът не винаги може да бъде интерпретиран категорично (възможно при използване на някои молекулярногенетични методи от най-ново поколение).
- Двусмислен, некатегоричен резултат, дължащ се на истински мозаицизъм (наличие на  $\geq 2$  клетъчни линии в един и същ организъм) или на контаминация с майчин генетичен материал. Това има своето значение за медико-генетичната консултация и тежестта на изява на съответното заболяване.
- Други случайни находки като условно балансирани преустройства (инверсии, транслокации), както и маркерни хромозоми (допълнителен неизвестен генетичен материал), невинаги могат да бъдат категорично интерпретирани (Anumba D, 2013).

Поведението на генетичния консултант включва:

- анализ на родителите (в никой от конкретните случаи няма отклонение в кариотипа при тях);
- проверка на съответните хромозомни преустройства в литературата с данни за корелация генотип-фенотип;

- предоставяне на информация на родителите с цел вземане на информирано решение за изхода на бременността.

От 27 патологични резултата 25 (92.6%) са били насочени към пренатална диагностика поради висок риск от БХС и/или биохимични маркери самостоятелно, а 2 – насочени поради *УЗ данни за аномалии* в плода. Нито една от 66 бременни жени с амниоцентеза по показание *майчина възраст* не разкрива патология. Резултатът от тази, макар и малобройна група, съвпада и потвърждава приетите от ISPD и ISUOG алгоритми, в които се приема, че сама по себе си възрастта не следва да се използва за оценка на риска от анеуплоидия и *не е показание за пренатална диагностика*. Оценка на ефекта от скрининговата програма в Холандия 2013 г. също потвърждава необходимостта от премахване на майчината възраст като показание (Engels M, 2013). Това не се противопоставя на данните за 11 бременни над 35 години (+ 3 на гранична възраст) с пренатално разкрита анеуплоидия, тъй като при тях са налични други показания извън възрастта. В контраст 8 жени (3 от КС, 2 от БХС и 3 с ИР) над 35 г. раждат дете с анеуплоидия и фалшиво отрицателен резултат от БХС. Ако инвазивната манипулация се предложи и проведе при всички жени над 35 г., тези 8 бременности биха били „уловени“ пренатално, но на този фон - 5 794 жени с нисък биохимичен риск ще бъдат изложени на ненужен риск. С навлизането на високо чувствителните и безопасни тестове за анеуплоидии НЕГИ се явява добра алтернатива за тези жени. Любопитна би била финансовата съпоставка между двата извън психологичната страна на проблема. Имайки предвид нарастващата средна възраст при бременните жени, също така би била любопитна тяхната първоначална нагласа по отношение пренаталната диагностика и влияе ли се тя от МГК и проведените скринингови изследвания. Това произтича от факта, че част от жените са провели АЦ по показание възраст, въпреки нисък риск от БХС. Проучване на литературата показва, че промяна в първоначалното решение при жени над 35 г. няма, независимо от проведената МГК (Godino L, 2013). Какво е, или какво би било, влиянието на МГК при решение за пренатална диагностика сред групата на жените под 35 г., както и какви са причините, също би могло да доведе до подобряване на МГК. Нито при една АЦ с показание желание на бременната (силно неспокойство) няма разкрита патология.

Очаквано, в близкото бъдеще, броят АЦ ще спадне драстично в резултат на масово прилаганите, с почти диагностичната стойност чувствителност, НЕГИ. Вероятно за поддържане на квалификацията на провеждащите манипулацията ще се наложи централизирането ѝ. От друга страна технологиите се развиват, разкрива се патогенезата на нови заболявания.

Намаляването на показаните със съмнение за хромозомна болест, най-вероятно, ще бъде за сметка на увеличаване пренаталната диагностика с цел превенция на моногенни болести. В тези случаи на висок риск е възможно предимплантационната диагностика да бъде предпочетена пред АЦ, въпреки провеждането и единствено в условия на ин витро фертилизация.

### 3. Медико-генетична консултация

Дейността на МГК е с много висока медицинска, социална и здравна ефективност, поради това тя е задължително изискване преди провеждане на генетични изследвания и при получаване на резултати. У нас активно се провежда при масовия дородов биохимичен скрининг. С тенденция за нарастване броя на изследваните пациенти и непрекъснатото въвеждане на нови технологии за генетични изследвания нараства и нуждата от квалифицирани консултанти, които не достигат в повечето страни. Това би могло да се реши с обучени за конкретен вид изследвания бакалавърски медицински кадри (сестри, акушерки и лаборанти) (Кременски И, 2011).

Доколкото оценката на риска не отговаря на очакванията за най-висока чувствителност, се налага адекватна предварителна устна и писмена информация за възможностите и ограниченията на метода. Особено важен е анализът на всички маркери, участващи в изчислението на риска, представени като допълнителна информация за консултиращия лекар. Тя е в голямата си част лабораторна и засяга предимно междинните рискове, произтичащи от припокриването на стойностите на маркерите при еу- и анеуплоидни бременности (Фиг. 20).



Фигура 20. Припокриване на стойностите на маркерите при еу- и анеуплоидни бременности

Недирективна и неимперативна, МГК дейността е най-ефективният подход за снемане на безпокойството, осъзнаване на риска за генетична болест и адекватно планиране на репродуктивно решение. Американската асоциация на генетичните консултанти (NSGC) създава методични указания за пре- и постнатална консултация, касаеща T21 поради необходимостта от предоставяне на квалифицирана грижа за тези семейства (Sheet K, 2011). Недостигът от компетентни консултанти в генетичните лаборатории довежда до решение за въвеждане на утвърдената във всички страни членки на ЕС и успешно внедрена у нас практика за информиране, дистанционно обучение, консултиране по интернет (телегенетика). Тя намалява броя на консултациите за дородовия скрининг на бременните благодарение на осигурения защитен достъп до резултатите в интернет и информирането по телефона. Това обаче в никакъв случай не отменя традиционната генетична консултация и прекия контакт със семейството в смисъла на разширен коментар върху хартиения вариант на резултата, получен от бременната жена.

Големият брой жени, подлежащи на масов скрининг, и дефицитът на специалисти по медицинска генетика или лабораторно квалифициран лекари се компенсира с писмен коментар и резолюция на резултати с некатегорични ниски или високи рискове. Проблем в скрининговата програма представлява анализът именно на тези резултати, особено при междинни рискове. Пропускането само на един случай може да доведе до финансови разходи, колкото годишните разходи за реактиви на цялата национална програма (Кременски И, 2011).

Удобството от онлайн получаването на резултат лишава част от бременните от МГК с разясняване и тълкуване на междинните рискове. Дали МГК и до колко тя би решила тези неясни ситуации е любопитно и би могло да се проучи с анкета на удовлетвореност от предоставената информация. Липсват данни за България каква е успеваемостта на този високоспециализиран похват, основен за специалистите по медицинска генетика. В България липсва стратегия за обучение за провеждане на лекари от други специалности и/или друг медицински персонал, което би било пречка в осигуряването на адекватна медицинска грижа. Не бива да се пропуска и фактът, че нуждата от МГК се разпростира далеч над скрининговата програма за анеуплоидии и обхваща заболявания във всеки клон на медицината (Лалчев С, 2014). Аналогично, разкриването на неясни находки при пренаталната диагностика е предизвикателство.

В тези случаи следва да бъдат утвърдени алгоритми за поведение в медицинския стандарт „Медицинска генетика“, както и организиране на мултидисциплинарни екипи за предоставяне на максимална и комплексна

грижа на семействата. Основен въпрос остава предприемането на аборт по медицински показания и дали и какви малформации се асоциират с наличната цитогенетична находка. Това би могло да се реши при централизирано решение за задължителна аутопсия при тези и подобни случаи. Въпреки наличните и навлизащи технологии с все по-задълбочени възможности за генетичен анализ въпросите за случайните находки и тези с неясно значение остават и дори се умножават (в светлината на пре- и постнаталното изследване). От друга страна, след цитогенетичен анализ на амниоцити и получаване на нормален кариотип за резултат е много важна добрата МГК за разясняване на възможностите и ограниченията на метода.

Друга гледна точка представя в книгата си „Пренатална диагностика и биополитика в България“ Ина Димитрова (2012), критично поднасяйки аргументи срещу селективния аборт. Това потвърждава МКГ като трудна дейност изискваща опит и квалификация. Генетичният консултант следва да се придържа максимално към двата основни стълба: принципите на безпристрастност или ненасочване (non-directivness) и абсолютно зачитане на автономията на пациента. Това кореспондира напълно с поведението на генетичните консултанти при разкритите от ЛМГВ случаи, водени от основните цели на МГК: предоставяне на информация на бременната / семейството за налична генетична патология във възможностите на изследването, даване на възможност за адекватна ранна терапия (където е възможно), както и подготовка на семейството за отглеждане на дете със специални потребности (при тяхно желание).

Много етични въпроси се повдигат в сферата на медицинската генетика и малко от тях имат еднозначен отговор, имайки предвид, че скринингът за T21 не постига ранна диагностика с цел лечение (Jong A, 2015). Според Jørgensen et al. 2014 възниква конфликт при комбиниране на скрининговото изследване за анеуплоидии и скрининг за други състояния като прееклампсия, поради което предлага те да бъдат разделяни.

Добро обучение и задълбочено познание от страна на медицинските кадри, адекватна финансова подкрепа и разбиране от страна на държавата са ключови за налагането на профилактичния подход като основна стратегия в здравеопазната система. Едновременно с това трябва да се възползваме от новите технологии, които ни предоставят нови възможности, създават се нови подходи и ни разкриват нови хоризонти.

## 4. Обобщение

За период от 10 години, от месец март 2005 г. до месец декември 2014 г., са проведени изследвания (КБХС1, БХС2 и ИР) на 22 839 бременни жени, преминали през Лаборатория по медицинска генетика при УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД - Варна. Разпределението по години показва намаляване в търсенето на късния тест за сметка на ранния и по-високо чувствителен скрининг тест (КБХС1), след въвеждането му в ЛМГВ. Тази тенденция се задържа трайно, което се наблюдава и извън обхвата на проучването – 2015 г., 2016 г. ЛМГВ изпълнява изискванията за необходимия минимум от 3000 анализа годишно за самостоятелно действаща сателитна база към общ сървър по европейските стандарти за качество и надеждност на резултатите.

Данните за разпределение на жените по възраст и в трите вида скрининг показват доминиране на жените под 35 години (87% при КБХС1, 68.7% при БХС2, 65.5% при ИР), като тази тенденция се запазва в годините. Средната възраст при КБХС1 29.9 г. (SD 4.6), БХС2 – 30.1 г. (SD 4.8), ИР - 32.8 г. (SD 4.8), разкрива зависимост жени в по-напреднала възраст да провеждат и двата анализа с изчисляване на ИР. По-високи рискове се изчисляват сред жени над 35 г. (58.4%), което резултира в по-висок процент ФП резултати (58.4%) сред тази група.

По отношение чувствителността на отделните генетични скринингови изследвания анализът на данните за изследвания период, базирайки се на цялата патология, показва предимство за КБХС1 със значимо по-нисък процент на ФП резултати от 1.5% за КБХС1 спрямо 8.6% за БХС2 и 6.8% за ИР. Като най-показателен маркер се счита ППС, който има най-добри стойности при ИР и КБХС1 7.7%, твърде незадоволително представият се БХС2 с ППС - 0.8%. Заедно с най-висока специфичност и чувствителност, съответно 98.5% и 60%, самостоятелно предлаганият КБХС1 се явява най-добрият подход за скрининг за анеуплоидии при бременни жени при използвания от нас cut off от 1/250. Очаквано по-добри показатели с намаляване на ФП резултати биха се достигнали при cut off от 1/100. Анализирайки показателите, по отношение само Т21, КБХС1 и ИР се представят равностойно 54.5% при значително завишени ФП резултати за ИР 7.1% (при КБХС1 - 1.5%). Въпреки че повишените рискове доминират в групата на жени над 35 г. (74.6%), в по-големия процент от случаите с верифицирана патология – 27 (56.3%), се касае за бременни до 35 г.

Общо разкритата патология при жени, провели БХС, е 53 случая (70.7% от очакваната за изследваната група).



Като цяло майчиният биохимичен скрининг, като метод на пренатална профилактика, акцентира върху разкриването на Т21. Подкрепя се широко възприетата нагласа за БХС като метод за пренатална генетична профилактика за синдрома на Даун. Останалата разкрита патология е по-скоро допълнителен принос. Създаването на централизирана уеб базирана система за пренатален скрининг и проследяване на бременностите би дало възможност за максимално пълен анализ на пренаталната скринингова програма за анеуплоидии при плода.

За периода от 10 години до 2016 включително амниоцентеза с провеждане на цитогенетичен анализ е проведена в ЛМГВ при общо 675 жени. Средната възраст на жените, провели АЦ, за изследвания период е 34.5 г. (5.14 SD), по-висока от тази на масовия биохимичен скрининг, тъй като по-високи рискове са изчислени при по-възрастни, а и АЦ се провежда по индикация възраст самостоятелно. Най-често показание е висок риск от БХС (82.8%). Разкрита е хромозомна патология при 27 от общо 675 (4%) бременности. В 22 (81.5%) бременни е разкрита фетална тризомия. В 5 случая (18.5%) се касае за хромозомна патология, извън очакваната, разкрита благодарение на приложения цитогенетичен анализ.

Дейността на МГК е с много висока медицинска, социална и здравна ефективност, поради това тя е задължително изискване преди провеждане на генетични изследвания и при получаване на резултати. От ключово значение е МГК при проблемните анализи на резултати с некатегорични ниски или високи рискове, т.нар. междинни рискове.

## **V. Изводи**

1. По отношение характеристиката на контингента бременни преминали скрининг се установява:

- нарастване броя на жените, провели само ранен комбиниран биохимичен скрининг и интегрирана оценка на риска, за сметка на пациентите, провели късен биохимичен скрининг;
- по-голям е процентът от бременни на възраст под 35 г. (74.6%), в тази група се разкриват и по-често хромозомна патология (58.3%);
- по-високи рискове се изчисляват сред жени над 35 г. (58.4%), което резултира в по-висок процент ФП резултати сред тях (58.7%).

2. По отношение чувствителността се установява:

- При ранен комбиниран скрининг чувствителността, ФП резултати и ППС за всички анеуплоидии са съответно 60%, 1.5%, 7.7%; параметрите само за тризомия 21 са съответно **54.5%, 1.5%, 5.1%**.
- При късен биохимичен скрининг чувствителността, ФП, ППС за всички анеуплоидии са съответно 47.6%, 8.6%, 0.8%; параметрите само за тризомия 21 са съответно **52.9%, 8.6%, 0.7%**.
- При интегриран риск чувствителността, ФП, ППС за всички анеуплоидии са 53%, 6.7%, 7.7%; параметрите само на тризомия 21 са съответно **54.5%, 6.7%, 5%**.

3. По отношение сравнителния анализ между трите вида скрининг се потвърждава:

- за тризомия 21, чувствителността на КБХС1 и ИР е еднаква, но при значително понисък процент ФП резултати при КБХС1, което му отрежда предимство;
- по отношение на цялата разкрита хромозомна патология **КБХС1 има най-висока чувствителност, при най-нисък процент ФП;**
- самостоятелното предлагане на късен биохимичен скрининг не следва да се препоръчва поради ниската чувствителност и високите ФП резултати;
- оценка за ИР има смисъл при резултати с междинни стойности от КБХС1;
- обобщено биохимичният скрининг има най-висока чувствителност по отношение на Т21, като останалите находки са по-скоро допълнителен принос.

4. По отношение резултатите от пренатален *цитогенетичен* анализ при високорискови бременности се установява:

- на фона на повишение в ръста на БХС дейност, броят на жените провели цитогенетичен анализ спада; най-вероятна причина е въвеждане на нови молекулярногенетични изследвания;
- в 5 от 27 случая (18.5%) се разкриват неанеуплоидни хромозомни преустройства, което потвърждава необходимостта от прилагането на цитогенетичния метод извън приложението му за най-чести анеуплоидии.

5. Потвърждава се, че майчината възраст над 35 г. не следва да се използва за оценка на риска за анеуплоидии, както и не е самостоятелно показание за провеждане на пренатална диагностична процедура.

6. Ултразвуковото изследване не постига повишаване на чувствителността на БХС в очакваната степен, като това се дължи на нисък процент регистрирани патологични УЗ маркери в случаи с хромозомна болест, НК в 9.1% и НТ в 37.5%.

- Надеждността на резултатите от скрининга се определя не само от биохимичните маркери, а и от ултразвукови маркери, които не са взаимозаменяеми и не се компенсират.

7. Дефинирани са нови задачи в дейността на МГК по отношение БХС:

- За повишаване чувствителността на скрининга допринася лабораторният анализ на параметрите, участващи в изчисляване на риска при *междинни* стойности, за БХС2 - 14.3%, и ИР - 11.7%.
- Подходът за генетична профилактика чрез БХС налага мултидисциплинарни усилия за постигане на крайната му цел; това определя интегриращата роля на МГК в този процес.

## **VI. Заключение и бъдещи насоки за развитие**

В резултат на пренаталната профилактична дейност за период от 10 години в Лаборатория по медицинска генетика при УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД - Варна, с проведен скрининг на 22 839 бременни (2005-2014) и цитогенетичен анализ при 675 (2006-2016) жени след АЦ, се утвърждава скринингът на бременни жени в комбинация с фетална анатомия като основен метод за генетична профилактика на най-честите хромозомни бройни аномалии. Той има смисъл при масово приложение без индикации по възраст. Пренасочването на бременните към по-ранния (в 11-14 г.с.) скрининг тест е важно постижение за успешното овладяване и приоритетно прилагане на по-високо чувствително изследване с възможност за последващ подход. С голяма значимост за профилактиката е УЗ преглед не само при „фетална морфология“ в 15-22 г.с., а и за целите на ранния тест - в 11-13 г.с. Надеждността на резултатите се определя от два вида изследвания. Правилният лабораторен анализ на биохимичните параметри в ранния и късен тест е условие за понижаване броя на фалшиво отрицателни случаи.

Въпреки масово навлизащите нови неинвазивни генетични изследвания *БХС остава най-широко приложимият метод за масова генетична*

*профилактика у нас* и заедно с МГК цели да осигури оптимална пренатална грижа, с възможно най-добър резултат както за майката, така и за плода.

По литературни данни са налични утвърдени допълнителни маркери (биохимични и ултразвукови), които би било уместно да се обсъдят за включване, с цел повишаване чувствителността и откриване на други състояния (пreekламписия, гестационен диабет). От друга страна единна информационна система, даваща възможност за проследяване на изхода от бременността, би позволила използване на настоящите биохимични маркери като показатели извън риска за анеуплоидия.

При анкетния метод биха могли да се допълнят въпроси с цел събиране на допълнителна информация (например за изчисляване боди мас индекс и други здравни и демографски данни).

Провеждането на анкета сред група от жени в репродуктивна възраст и/или акушер гинеколози за информираност по отношение необходимостта и желанието за прилагане и предлагане на неинвазивни генетични изследвания, като и като цяло възможностите и ограниченията на профилактичните генетични изследвания, би било уместно с цел повишаване ефекта от провежданата програма.

Допълнителна информация за удовлетвореността от МГК също би дала възможност за повишаване качеството на предоставената цялостна грижа за бременната. Би могло да се проследи каква е и има ли промяна в нагласата на семействата спрямо изхода от бременност с T21.

Профилактиката е медицината на бъдещето. Като метод за вторична профилактика генетичната скринингова програма за оценка на риск се предлага масово на всички бременни жени в страните с напреднало здравеопазване и е алтернативен подход, предлаган на всички жени независимо от възрастта. Информираността както на обществеността, така и на лекарите за наличието на генетична профилактика, заедно с разширяване методичните възможности в генетичните центрове, са от основно значение за нейната ефективност. Необходими са съвместни усилия на квалифицирани акушер-гинеколози, лабораторни специалисти от сертифицирани лаборатории и генетични консултанти. Дали е възможно да се покрият всички бременности, за да добие скрининговата програма масов характер, е въпрос не само на мащабна организация, но и предимно финансов проблем.

## **VII. Приноси на дисертационния труд**

### **1. Приноси с оригинален и научно-приложен характер:**

- За първи път в нашата страна се извършва и представя систематизирана научно-практическа разработка за оценка на дейността на майчиния биохимичен скрининг за продължителен период от време в широк регион от нашата страна.
- Настоящата работа е единственото публикувано изследване у нас сред репрезентативна популация от бременни жени, позволяващо сравнение с резултатите на други популации за оценка на подхода за провеждане на профилактичен генетичен скрининг.
- Настоящата работа е едно от малкото изследвания у нас, което позволява на база изчислена чувствителност и сравнителен анализ на прилаганите подходи за скрининг за анеуплоидии да изведе най-ефективния от тях.
- За първи път в нашата страна се проследяват високорисковите бременности за 10-годишен период от време като алгоритъм на поведение за по-нататъшно генетично изследване и изхода от него.

### **2. Приноси с потвърдителен характер:**

- Доказана е значимостта на високоспециализираното ултразвуково изследване за определяне оценката на риска за анеуплоидии.
- Потвърдена е майчината възраст над 35 години като високорисков биологичен фактор за анеуплоидии, който обаче не следва да се използва самостоятелно за оценка на риска и сам по себе си не е показание за провеждане на амниоцентеза.
- Потвърждава се биохимичният скрининг като най-честото показание за провеждане на амниоцентеза и ефективен метод за разкриване на хромозомна патология при пренатална диагностична процедура.
- Дефинирани са нови задачи в дейността на генетичната консултация за най-адекватна интерпретация на лабораторните резултати от скрининг и подход на поведение, особено при междинни стойности на риска.

## **VIII. Научни публикации по темата на дисертационния труд**

1. Ангелова Л., В. Гаданчева, Д. Константинова, М. Стоянова, **М. Хачмерян**, Б. Яков, И. Кременски. Скрининг при бременни жени – подход за генетична профилактика. Част 1. Ранен и късен скрининг. Акушерство и гинекология, 2013, том 52, бр.5, 8-13.
2. Ангелова Л., В. Гаданчева, Д. Константинова, М. Стоянова, **М. Хачмерян**, Б. Яков, Я. Петрова, И. Кременски. Скрининг при бременни жени – подход за генетична профилактика. Част 2. Последователен скрининг с интегрирана оценка на риска. Акушерство и гинекология, 2013, том 52, бр.5, 14-18.
3. **Хачмерян, М.**, Л. Ангелова. Пренаталната диагностика като основен подход за вторична генетична профилактика. Варненски медицински форум, 2016, 1, том 5, с.7-12.
4. **Хачмериян, М.**, Л. Ангелова, Ст. Иванов, А. Савов. Анализ на възможностите и ограниченията на скрининг при бременни за синдром на Даун и други често срещани хромозомни болести за период от две години Акушерство и гинекология, 2016, том 55, бр.3, 14-20.

## IX. Научни съобщения по темата на дисертационния труд

1. **Hachmeriyan M.**, L.Angelova, M.Stojanova, D.Konstantinova, B.Yakov, R.Vazharova; Maternal biochemical screening as an approach for genetic prevention - the experience of the Laboratory in Medical Genetics, University hospital "St.Marina " - Varna, Bulgaria. European Human Genetics Conference 2013 June 8-11, 2013 Paris, France. European Journal of Human Genetics, Nature Publishing Group, vol 21, suppl 2, June 2013, Abstracts, 594
2. Angelova L., V.Gadancheva, D.Konstantinova, M.Stoyanova, **M.Hachmerian**, R. Vazharova, I.Kremenski. The experience of the Genetic Laboratory of Varna, Bulgaria on prenatal biochemical screening for risk estimation of Down syndrome and other common chromosome diseases 10th Balkan Congress of Medical genetics and 2nd Alps Adria Meeting on Human Genetics on 10th -12th October 2013, Bled , Slovenia. Book of Abstracts, 97.
3. Ангелова Л., В. Гаданчева, Д. Константинова, М. Стоянова, **М. Хачмерян**, Р. Въжарова, И. Кременски. Опитът на генетична лаборатория варна с пренатален биохимичен скрининг за оценка на риска за синдром на Даун и други често срещани хромозомни болести. 50 годишен юбилей на Катедра по педиатрия и медицинска генетика. Варненски Медицински Форум, 2013, том 2, приложение 5, 9.

## **Х. Благодарности**

Искрено благодаря на:

- на научния ми ръководител доц. д-р Людмила Ангелова, д.м.
- на екипа на Лаборатория по медицинска генетика - Варна: Светлана Койнова и Корнелия Димитрова, изработвали биохимичния скрининг, Марияна Златева, Мария Цветкова, Цанка Русева, изработвали цитогенетичните проби, д-р Димитрина Константинова и д-р Милена Стоянова – медикогенетични консултанти в кабинета по Медицинска генетика, както и на всички бивши и нови членове на екипа, работещи активно върху майчиния биохимичен скрининг
- на доц. Искра Мирчева и доц. д-р Трифон Червенков за помощта при обработката на данни
- на екипа на Национална генетична лаборатория - София, изчислили всички резултати от биохимичен скрининг, включени в настоящата работа; на екипа на Частна генетична лаборатория Геника - София, за оказаното съдействие при събиране на информацията, включена в настоящата работа; на екипа на частна АГ болница „Майчин дом“ - Варна, за оказаното съдействие при събиране на информацията и единствени извършващи амниоцентези във Варна, резултати от които са включени в настоящата работа
- на семейството ми.